

## 卵の精子受容機構に関する解析

著者	経塚 啓一郎
学位授与機関	Tohoku University
学位授与番号	943
URL	<a href="http://hdl.handle.net/10097/38166">http://hdl.handle.net/10097/38166</a>

博士論文

卵の精子受容機構に関する解析

経塚啓一郎

平成二年

## 目次

第1章 序論、精子侵入機構に関する問題点	1
第2章 ヒトデ卵の精子受容過程の観察	13

### 序論

### 材料と方法

### 結果

### 考察

### 要約

### 文献

第3章 精子侵入過程におけるマイクロフィラメント系の関与	29
------------------------------	----

### 序論

### 材料と方法

### 結果

### 考察

### 要約

### 文献

第4章 精子頭部包み込み反応に関する解析	
----------------------	--

第1節 先体糸切断精子に対するヒトデ卵表の受容反応	44
---------------------------	----

### 序論

### 材料と方法

### 結果

### 考察

### 要約

### 文献

第2節 ウニ卵によるヒトデ精子頭部包み込み反応	57
－ Polyethylene glycol による交雑受精の誘起－	
序論	
材料と方法	
結果	
考察	
要約	
文献	
第5章 総合考察	68
謝辞	82
図及び表	83
参考文献	



## 第1章 序論、精子侵入機構に関する問題点

受精過程とは、精子が卵の外囲構造（ゼリー層、卵黄膜など）に接触してから、卵内に侵入して、精核が卵核と合体するまでをさす。受精過程における諸現象の解析はこの一世紀にわたって進められ、これまでに、精子が卵に結合するまでの現象（精子の活性化、先体反応、種特異的結合など）および精子が卵内へ侵入した後にみられる変化（卵の表層変化、発生開始など）について、多くの優れた研究が成されてきた（cf. Metz and Monroy, 1985）。しかし、精子が卵表面（卵原形質膜）に接触してから卵と融合し、卵内へ取り込まれる過程（精子侵入 sperm entry）について解析した研究は少ない。これは精子の侵入過程は短時間で完了するものであり、卵表の極く狭い局所で起こるため、卵表に付着した多くの精子のうちから、卵に有効に作用しつつあるものを見いだすのが困難であることに起因すると思われる。さらに、この過程に関わる精子および卵の変化は、これに先行して起こる精子の先体反応や、後に続く卵の活性化などの諸現象と重複して現れることも、解析を困難にしているものと思われる。そこで、精子の卵細胞質内への侵入過程を解析するためには、この過程に関与する個々の現象（素過程）を区別し、それぞれの素過程が互いに因果関係を持ちながら進行するのか、あるいはそれぞれが独立に進行する現象であるのか明らかにする必要がある。本研究では精子侵入時にみられる卵表および精子の構造変化が一連の受精過程の中でどの様に関連しているのかを解析する。

海産無脊椎動物の受精過程の形態学的観察は、ウニ類、二枚貝類、多毛類などで詳細に報告されている（Tyler, 1965; Colwin and Colwin, 1967; Austin, 1968; Summers and Hylander, 1974; Summers *et al*, 1975; Longo, 1987）。現在までに明らかになっている知見より、受精過程の進行はおおよそ次の様にまとめられる。

海産無脊椎動物の卵は、原形質膜の外側を何層かの外囲構造により包まれている。精子は卵の表面に達するためにはこの外囲構造を通過しなければならない。多くの動物種では、精子は外囲構造に接触して先体反応を起こし、先体突起を形成する (cf. Dan, 1967)。先体反応時に先体胞から放出される卵膜ライシンにより卵の外囲構造を溶解するか (cf. Hoshi, 1985)、先体突起が外囲構造へ機械的に侵入することにより (Hylander and Summers, 1977; Kyojuka and Osanai, 1985)、先体突起は卵原形質膜と接触する。先体突起が卵原形質膜と接触または融合した後、その部分の卵表に次の2つの変化が現れる。1つはこの部分の卵表層に卵黄粒などを含まない透明な卵細胞質が移動してきて、細胞質突起 (受精丘または精子侵入路) を形成することであり、他は卵表の微絨毛が伸長して精子頭部を包み込む反応 (sperm-engulfing response) を示すことである。次いで精子核は細胞質突起中に侵入し、やがて卵の内部に移動する。一方、先体突起が卵表と結合または融合した時、卵の活性化が始まり、ウニ類や多毛類の卵では表層粒が崩壊し、受精膜が形成される (遠藤, 1966; Carrol and Epel, 1975)。

本研究では、これらの受精過程のうちで、先体突起が卵原形質膜に接触してから精子核が卵内に取り込まれるまでにみられる現象を解析し、精子侵入の機構を明らかにしようとするものである。受精時に、精子は鞭毛運動により卵表面に到達する。ウニ卵においては卵黄膜に結合すると精子は運動を停止することが観察されており (Dan, 1950; Epel *et al*, 1977)、卵内への精子侵入は、精子自身の運動によるものでなく、卵により引き込まれるか、卵と精子の相互作用によるものと考えられている (Epel 1975; Vacquier, 1981)。この精子侵入に関して、次の問題点を指摘できる。

(1) 先体突起と卵原形質膜との結合またはそれに続く原形質膜融合が、精子頭部の卵内への侵入を導くための先行過程として必要であるのであろうか。ほ乳類

の場合、精子先体突起ではなく、精子頭部側面の原形質膜が卵原形質膜と融合した後、精子頭部の卵内への侵入が起こる（Noda and Yanagimachi, 1976; Yanagimachi, 1988）。また石灰海綿の場合、精子は一旦襟細胞中に取り込まれた後、卵母細胞に渡されるため、直接両性配偶子間の原形質膜融合は起こらない（Duboscq and Tuzet, 1937）。これらのことは精子侵入過程の一部が原形質膜融合に先行して、あるいは膜融合とは独立に進行する可能性を示唆する。

（２）先体突起が卵表層に達すると、その部分に卵細胞質の突起（受精丘または精子侵入路）が発達してくるが、この細胞質突起は精子侵入に積極的な役割を果たしているのであろうか。環形動物（Colwin and Colwin, 1961）あるいは軟体動物（Longo and Anderson, 1969, 1970; Hylander and Summers, 1977）の場合、精子先体突起が卵膜上の微絨毛、もしくは卵膜下の卵原形質膜と融合すると、先体突起の周囲に卵細胞質の突出（精子侵入路）が形成され、受精する精子はこの突出を通して卵内へ侵入する。一方、ウニ卵で観察される受精丘は精子侵入後に発達することから、受精丘の発達は精子受容の結果である可能性がある。

（３）棘皮動物の精子先体糸（Tilney *et al*, 1973; Jessen *et al*, 1973; Schroeder and Christen, 1982）およびウニ卵表層には（Epel and Vacquier, 1978; Boyle and Ernst, 1989）アクチンフィラメントが存在する。精子侵入に伴い、ウニ卵表の精子侵入部位に形成される受精丘中（Longo and Anderson, 1968; Longo, 1980; Tilney and Jaffe, 1980; Cline and Schatten, 1986）および、未成熟なウニ卵母細胞に精子が侵入する際に形成される細胞質突起中にもアクチンフィラメントが観察される（Franklin, 1965）。また、アクチンあるいはアクチニンが精子侵入部位へ集合してくることも明らかになっている（Hamaguchi and Mabuchi, 1986, 1988）。このことより、精子の卵内への侵入には精子先体糸および卵表層のアクチンフィラメントが密接に関わっているのではないかと考えられている（Vacquier, 1981）。

(4) 卵表面の微絨毛状突起による精子頭部の包み込み (sperm engulfment) は、精子の取り込みに関与している現象であろうか。この反応は、有尾両性類 (Picheral, 1977)、無尾両性類 (Elinson and Manes, 1978)、ハムスター (Shalgi and Phillips, 1980) などで顕著に観察される。それは、卵表層の一部もしくは卵微絨毛が受精する精子周囲に突出し、頭部周囲に絡みつく反応である。ウニ卵においても観察されているが (Schatten and Mazia, 1976; Schatten and Schatten, 1980)、種によっては顕著な微絨毛の伸長の観察されない場合もある (Usui *et al*, 1983)。一方、ウニ裸卵に先体反応を誘起した直後の精子を媒精した時、精子頭部は卵表面の微絨毛で包まれるが、原形質膜融合は起こらない (Kyojuka and Osanai, 1988)。卵表面の微絨毛による精子頭部の包み込みは、ウニの場合には原形質膜融合の後に起こり、ほ乳類の場合には原形質膜融合に先行していると言われている。従って、この反応は原形質膜融合に依存するものでもなければ原形質膜融合を導くものでもないと考えられる。

このような精子侵入に伴う卵表層の局所的な変化 (反応) を解析する時、受精丘形成あるいは精子頭部包み込み反応を表層粒の崩壊など卵の全周で起こる付活反応から区別し、さらに両性配偶子間の原形質膜融合と切り放して解析できると有利である。従来より、受精過程を段階分けしてより詳細な検討を行うためにいくつかの方法が提唱されてきた。その内の一つは、阻害剤を用いて受精過程の進行の一部を抑制する方法である。両性配偶子間の原形質膜融合は、過剰カリウム海水 (Baker and Presley, 1969)、マグネシウム欠如海水 (Sano and Mohri, 1976)、fluorescein dye (Carroll and Levitan, 1978; Finkel *et al*, 1981; Eckberg and Perotti, 1983) などで阻害される。これらの阻害剤で膜融合を抑制した場合、精子侵入と表層粒の崩壊を伴った卵の付活は起こらない。しかし、一般に阻害剤は卵表面のみならず卵内部に様々な影響を与えることが予想されるので、膜融合阻害剤による実験結果からだけで、膜融合がそれに続く受精過程の

進行を導くものであると断定できない。

受精過程の一部を阻害する方法として、我々は異門、異綱間の交雑受精法を用いてきた。ウニの裸卵（ゼリー層と卵黄膜を除去した卵）に先体反応を起こした直後のヒトデの精子を媒精すると、両性配偶子間の原形質膜融合も卵の活性化も起こらないが、卵表は一種の精子受容反応を示す（Kyo-zuka and Osanai, 1988）。ウニ卵にカキ精子を加えた場合には、精子は卵を活性化することなく卵内に侵入する（Osanai and Kyo-zuka, 1982）。これらの事実は、正常では連続して起こる両性配偶子の原形質膜融合、精子受容、および卵の活性化がそれぞれ独立した現象であることを示唆する。そこで、本研究においては、受精時の卵および精子の構造変化の明瞭なヒトデを主な材料として、阻害剤および異綱間交雑によって、受精過程を途中で阻止し、各受精段階の相互関係を解析した。

ヒトデ類はウニ類と同じ棘皮動物門に属し、その配偶子は基本的にウニ類と同様の性質を持ちながら、ウニ類にない特色およびメリットをも兼ね備えている。ウニの精子は極く短い先体突起を形成するのに対し、ヒトデ精子は、先体反応により  $15\ \mu\text{m}$  以上に達する長い先体糸を形成する（Dan, 1954; Colwin and Colwin, 1956）。そこで、ヒトデ精子を用いることにより、受精時における精子と卵表との反応を、精子先体糸と卵表、および精子頭部と卵表との反応に区別し、精子侵入過程を段階分けして詳細に観察することが可能になった。さらに、顕著な受精丘が形成され、精子侵入部位の卵表の変化を観察することが容易である。また卵は直径が  $130 \sim 160\ \mu\text{m}$  と大きく、光学顕微鏡にも、電子顕微鏡の観察にも適当な大きさであり、顕微注射を含めた顕微操作も容易である。2種の材料および採集場所を変えることで3月から12月までほぼ1年を通じて成熟した材料を確保できる。

本研究では、上述の利点を活用して、精子侵入過程を観察し、精子に対する卵表の包み込み反応が卵の付活や両性配偶子間の原形質膜融合とは独立した精子頭

部に対して起こる反応であることを明らかにし、さらに精子の取り込みに関する先体突起および受精丘の役割を解析した。

## 文献

- Austin C.R. (1968): Ultrastructure of Fertilization. Holt, Reinhart and Winston, New York.
- Baker P.F. and Presley R. (1969): Kinetic evidence for an intermediate stage in the fertilization of the sea urchin egg. *Nature* 221: 488-490.
- Boyle J.A. and Ernst S.G. (1989): Sea urchin oocytes possess elaborate cortical arrays of microfilaments, microtubules, and intermediate filaments. *Develop. Biol.* 134: 72-84.
- Carroll E.J.Jr. and Levitan H. (1978): Fertilization in the sea urchin, Strongylocentrotus purpuratus is blocked by fluorescein dyes. *Develop. Biol.* 63: 432-440.
- Carroll E.J. and Epel D. (1975): Isolation and biological activity of the proteases released by sea urchin eggs following fertilization. *Develop. Biol.* 44: 22-32.
- Colwin L.H. and Colwin A.L. (1956): The acrosome filament and sperm entry in Thyone briareus (Holothuria) and Asterias. *Biol. Bull.* 110: 243-257.
- Colwin L.H. and Colwin A.L. (1961): Changes in the spermatozoon during fertilization in Hydroides hexagonus (Annelida). II. Incorporation with the egg. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* 10: 255-274.
- Colwin L.H. and Colwin A.L. (1967): Membrane fusion in relation to sperm-egg association. In Metz C.B. and Monroy A. (eds): "Fertilization.", Academic Press, New York. pp. 295-368.
- Cline C.A. and Schatten G. (1986): Microfilaments during sea urchin

- fertilization: Fluorescence detection with rhodaminyl phalloidin.  
Gamete Res. 14: 277-291.
- Dan J. (1950): Sperm entrance in echinoderms observed with the phase microscope. Biol. Bull. 99: 399-411.
- Dan J. (1954): Studies on the acrosome. II. Acrosome reaction in starfish spermatozoa. Biol. Bull. 107: 203-218.
- Dan J. (1967): Acrosome reaction and lysins. In Metz C.B. and Monroy A. (eds.): "Fertilization.", Academic press, New York, pp. 237-293.
- Duboscq O. and Tuzet O. (1937): L'ovogénèse la fécondation et les premiers stades du développement des éponges calcaires. Arch. Zool. exp. gén. 79: 157-316.
- Eckberg W.R. and Perotti M.E. (1983): Inhibition of gamete membrane fusion in the sea urchin by quercetin. Biol. Bull. 164: 62-70.
- Elinson R.P. and Manes M.E. (1978): Morphology of the site of sperm entry on the frog egg. Develop. Biol. 63: 67-75.
- Epel D. (1975): The program and mechanism of fertilization in the echinoderm egg. Amer. Zool. 15: 507-522.
- Epel D., Cross N.L. and Epel N. (1977): Flagellar motility is not involved in the incorporation of the sperm into the egg at fertilization. Develop. Growth and Differ. 19: 15-21.
- Epel D. and Vacquier V.D. (1978): Membrane fusion events during invertebrate fertilization. In Poste G. and Nicolson G.L. (eds): "Cell Surface Reviews, Vol. 5, Membrane fusion." Elsevier/North-Holland Biochemical Press, Amsterdam, pp. 1-63.
- 遠藤善之 (1966): 受精、発生、卵割の初期 "現代の生物学 4 発生と分化"



- 岩波書店 pp. 1-61.
- Finkel T., Levitan H., and Carroll E.J. (1981): Fertilization in the sea urchin Arbacia punctulata inhibited by fluoresein dyes evidence for a plasma membrane mechanism. Gamete Res. 4: 219-229.
- Franklin L. (1965): Morphology of gamete membrane fusion and of sperm entry into oocytes of the sea urchin. J. Cell Biol. 25: 81-100.
- Hamaguchi Y. and Mabuchi I. (1986): Alpha-actinin accumulation in the cortex of echinoderm eggs during fertilization. Cell Motil. Cytoskeleton 6: 549-559.
- Hamaguchi Y. and Mabuchi I. (1988): Accumulation of fluorescently labeled actin in the cortex layer in sea urchin eggs after fertilization. Cell Motil. Cytoskeleton 9: 153-163.
- Hoshi M. (1985): Lysins. In Metz C.B. and Monroy A. (eds): "Biology of Fertilization. Vol.2 Biology of the Sperm.", Academic press, New York, pp. 431-462.
- Hylander B.L. and Summers R.G. (1977): An ultrastructural analysis of the gametes and early fertilization of two bivalve molluscs, Chama macerophylla and Spisula solidissima with special reference to gamete binding. Cell Tissue Res. 182: 469-489
- Jessen J., Behnke O., Wingstrand K.G., and Rostgaard J. (1973): Actin-like filaments in the acrosomal apparatus of spermatozoa of a sea urchin. Exp. Cell Res. 80: 47-54.
- Kyozuka K. and Osanai K. (1985): Sperm entry in oyster (Crassostrea gigas) oocytes. Bull. Mar. Biol. Stn. Asamushi, Tohoku Univ. 18: 25-34.

- Kyozuka K. and Osanai K. (1988): Sperm-engulfing response of sea urchin egg surfaces inseminated with acrosome-reacted starfish sperm. *Gamete Res.* 21: 169-178
- Longo F.J. and Anderson E. (1968): The fine structure of pronuclear development and fusion in the sea urchin, Arbacia punctulata. *J. Cell Biol.* 39: 339-368.
- Longo F.J. and Anderson E. (1969): Cytological aspects of fertilization in the lamellibranch, Mytilus edulis. I. Polar body formation and development of the female pronucleus. *J. Exp. Zool.* 172: 69-96.
- Longo F.J. and Anderson E. (1970): An ultrastructural analysis of fertilization in the sulf clam, Spisula solidissima. I. polar body formation and development of the female pronucleus. *J. Ultrastruct Res.* 33: 495-514.
- Longo F.J. (1980): Organization of microfilaments in sea urchin (Arbacia punctulata) eggs at fertilization: Effect of cytochalasin B. *Develop. Biol.* 74: 422-433.
- Longo F.J. (1987): "Fertilization." New York, Chapman and Hall.
- Metz C.B. and Monroy A. (1985): "Biology of Fertilization." New York, Academic Press.
- Noda Y.D. and Yanagimachi R. (1976): Electron microscopic observations of guinea pig spermatozoa penetrating eggs in vitro. *Develop. Growth and Differ.* 18: 1976.
- Osanai K. and Kyozuka K. (1982): Cross fertilization between sea urchin eggs and oyster spermatozoa. *Gamete Res.* 5: 49-60.
- Picheral B. (1977): La Fecondation chez le triton *Pleurodele* II. La

- penetration des spermatozoides et la reaction locale de l'oeuf. J. Ultrastruct. Res. 60: 181-202.
- Sano K. and Mohri H. (1976): Fertilization of sea urchin heads  $Mg^{2+}$  in sea water. Science 192: 1339-1340.
- Schatten G. and Mazia D. (1976): The penetration of the spermatozoon through the sea urchin egg surface at fertilization. Observations from the outside on whole eggs and from the inside on isolated surfaces. Exp. Cell Res. 98: 325-337.
- Schatten H. and Schatten G. (1980): Surface activity at the egg plasma membrane during sperm incorporation and its cytochalasin B sensitivity. Scanning electron microscopy and time-lapse video microscopy during fertilization of sea urchin Lytechinus variegatus. Develop. Biol. 78: 435-449.
- Shalgi R. and Phillips D. (1980): Mechanics of sperm entry in cycling hamsters. J. Ultrastruct. Res. 71: 154-161.
- Schroeder T.E. and Christen R. (1982): Polymerization of actin without acrosomal exocytosis in starfish sperm. Visualization with NBD-phalloidin. Exp. Cell Res. 140: 368-371.
- Summers R.G. and Hylander B.L. (1974): An ultrastructural analysis of early fertilization in the sand dollar Echinarachnius parma. Cell Tissue Res. 150: 343-368.
- Summers R.G., Hylander B.L., Colwin L.H., and Colwin A.L. (1975): The functional anatomy of the echinoderm spermatozoon and its interaction with the egg at fertilization. Amer. Zool. 15: 523-551.
- Tilney L.G., Hatano S., Ishikawa H., and Mooseker M. (1973): The

- polymerization of actin: its role in the generation of the acrosomal process of certain echinoderm sperm. *J. Cell Biol.* 59: 109-126.
- Tilney L.G. and Jaffe L.A. (1980): Actin, micrivilli, and the fertilization cone of sea urchin eggs. *J. Cell Biol.* 87: 771-782.
- Tyler A. (1965): The biology and chemistry of fertilization. *Amr. Naturalist.* 94: 309-334.
- Usui N., Sano K., and Mohri H. (1980): The surface events at fertilization of the sea urchin egg. I. Events on the surface of the vitelline coat. *Develop. Growth and Differ.* 22: 461-473.
- Vacquier V.D. (1981): Dynamic changes at the egg cortex. *Develop. Biol.* 84: 1-26.
- Yanagimachi R. (1988): Sperm-egg fusion. *Curr. Top. Membr. Transp.* 32: 3-43.

## 第2章 ヒトデ卵の精子受容過程の観察

### 序論

生きている卵で動物の受精過程を観察したのは、ヒトデ卵を用いた Fol (1877) の研究が最初であると言われている。Fol は精子と卵表との間に糸状の構造があり、この構造（迎接突起 reception cone）は卵に由来するもので、これによって精子は受動的に卵に引き込まれるものであると考えた。この Fol の主張は、Chambers (1923,1930) によって支持されている。その後、位相差顕微鏡の開発によって、精子の先体反応が発見され、ヒトデ精子の先端に現われる糸状構造は精子先体に由来する先体系であることが明らかにされた (Dan, 1950, 1954)。近年になって、微分干渉顕微鏡の進歩に伴って、ヒトデ生卵でのより詳細な記載がなされるようになった (Hirai *et al.*, 1981)。しかし、これまでに、ヒトデ卵の受精過程の透過型電子顕微鏡による研究の報告はみられない。その理由は、(1) 近年まで卵母細胞の成熟を人工的に進行させることが困難で人工受精が難しかったこと、(2) ウニ卵や二枚貝卵に比べて卵径が 1.5 ~ 2 倍大きく、精子侵入のような卵表の局所で起こる事象を観察することが難しかったことのためであろう。

現在ではヒトデの卵成熟ホルモン、1-methyladenine による卵成熟機構が明らかにされており (Kanatani, 1969)、これによりヒトデ卵母細胞の減数分裂を再開させ、受精可能な第一減数分裂中期の卵を大量に得られるようになり、

(1) の困難は克服されている。本研究では、(2) の問題を多精受精卵を利用することによって解決した。第二極体放出後の減数分裂を完了したヒトデ過熟卵は、精子濃度を高めるだけで容易に多精受精を誘起できる (Fujimori and Hirai, 1979)。多精受精卵では、精子の卵への侵入部位が多くなるので、精子侵入過程の諸相を追跡することがより容易である。ヒトデ過熟卵は、電氣的な早い

多精拒否機構は損なわれているが (Miyazaki and Hirai, 1979)、受精時の精子濃度を下げると正常発生率が増加すること、光学顕微鏡による観察においては、精子侵入時の卵表の形態変化は正常受精時と同様であることより (Hirai *et al.*, 1981)、精子侵入様式は正常受精過程と同様であると考えられる。本章では、ヒトデ過熟卵への精子侵入過程の微細構造を解析した。

### 材料と方法

**材料** 材料はヒトデ (*Asterias amurensis*) およびイトマキヒトデ (*Asterina pectinifera*) を用いた。ヒトデは 4 月初旬に浅虫臨海実験所周辺で採集し、8 °C の冷却水槽で飼育し実験に供した。イトマキヒトデは、9 月初旬に実験所周辺で採集したものを 15 °C の水槽で飼育した。卵母細胞は、ヒトデ雌の卵巣を取り出し細かく切った後、ピンセットを用いて海水中に絞り出した。この卵母細胞懸濁液をガーゼで濾過し、卵巣片を除いた。得られた卵母細胞は、第一減数分裂前期 (卵核胞期) で留まっている。この卵を、ヒトデ卵成熟ホルモンである 1-methyladenine ( $1 \mu\text{M}$ 、Sigma Chemical Co.、蒸留水に 1 mM となるように溶いた保存液を使用時に海水で希釈) を含む海水中に移して、卵成熟を進行させた。ヒトデおよびイトマキヒトデ卵母細胞の成熟分裂の時間経過を図 1-1 に示した。実験には 1-methyladenine 添加後 180 分のヒトデ過熟卵、もしくは 1-methyladenine 添加後 110 分のイトマキヒトデ過熟卵を用いた。精子は精巣から絞り出した精子 (dry sperm) を、 $10 \mu\text{M}$  histidine 海水で希釈した後媒精に用いた。Histidine 海水中で、精子の運動性が増大し、受精時期の同調性の良くなることが知られている。媒精は、最終精子濃度が  $10^{-3}$  dry sperm ( $2.4 \times 10^7/\text{ml}$ ) となるように行った。

### 顕微鏡ビデオ撮影装置による観察

ノマルスキー微分干渉顕微鏡（ニコン OPTIPHOT、透過型微分干渉装置 NT）にビデオカメラヘッド（池上 CTC-8000）を取り付け、モニター上で観察すると同時にビデオテープレコーダー（ビクター BR-8600）に記録した。卵は海水中に懸濁したものを 1 滴ピペットでスライドガラス上に滴下し、4 隅に 50～100  $\mu\text{m}$  のガラスビーズを含んだワセリンを塗ったカバーガラスで上から押さえた。媒精時にカバーガラスの一方の端から希釈精子を静かに注入し、他方より濾紙で海水を吸い出した。ビデオテープレコーダーに記録された像を、再生時に精子がゼリー層上へ到達した時点で、録画面より 10 秒間隔で写真撮影し、この写真上で卵表と精子頭部との距離および受精丘の高さを計測した。

### 電子顕微鏡用試料の作製

ヒトデ過熟卵は、媒精後 30 秒間隔で Karnovsky の glutaraldehyde - paraformaldehyde 固定液（40 mg/ml の paraformaldehyde、5% glutaraldehyde、0.5 mg/ml calcium chloride を 0.2 M sodium cacodyrate（pH 6.9）に溶いたもの）に 45 分間入れ前固定を行った。この時、透過型電子顕微鏡用試料には、卵ゼリー層を残すために 0.05 % Janus green を加えた固定液を用いた。この試料を濾過海水で 3 回にわたり 60 分間洗い、1 % osmium tetroxide 海水で 60 分間後固定し、蒸留水で洗った後、アセトンシリーズで脱水し、Spurr 樹脂に包埋した。ウルトラトーム（Porter-Blum MT-1）で作成した超薄切片を、uranyl acetate および lead citrate で二重染色し、透過型電子顕微鏡（JEM T-8）で観察した。走査型電子顕微鏡用試料の場合、glutaraldehyde - paraformaldehyde および osmium tetroxide の二重固定を行い、蒸留水で洗った後、エタノールシリーズで脱水し、液体炭酸ガスで置換し、臨界点乾燥装置（日立 CPD-1）で乾燥を行なった。さらに試料に金を蒸着し、走査型電子顕微鏡（日立-明石 MINISEM-4）で観察した。

## 結果

### 1. 顕微鏡ビデオ撮影装置によるヒトデ精子侵入過程の観察

イトマキヒトデ過熟卵への精子侵入の時間経過をみるために、ビデオ撮影装置を用いて連続観察を行った。イトマキヒトデ卵は直径が約  $160\ \mu\text{m}$  であり、卵外圍構造として、厚さ約  $10\ \mu\text{m}$  のゼリー層およびその下に厚さ約  $0.5\ \mu\text{m}$  の卵黄膜が存在する。精子侵入過程の1例を図 1-2, 1-3 に示した。媒精後、精子は鞭毛運動によりゼリー層表面に到達し、頭部先端を卵方向に向けて先体反応を起こす。先体反応により精子頭部先端より伸長した細い先体系はゼリー層中に侵入し、先体系の先端は卵黄膜と接触する (Dan, 1954; Colwin and Colwin, 1956; Ikadai and Hoshi, 1982)。精子尾部による一定周期の規則正しい鞭毛運動は、精子頭部がゼリー層表面と接触した時点で停止し、その後は希に間欠的な鞭毛の動きが起こるだけであった。精子の頭部は先体系によって卵黄膜と連絡した状態で約 21 秒間 ( $20.7 \pm 3.4$  秒、平均値  $\pm$  標準誤差、 $n=11$ ) ゼリー層の表面で停止した後、ゼリー層中への侵入を開始した (表 1-1)。その時先体系融合部の卵表に微小な突起 (受精丘) が形成され、この周囲より受精膜が上昇し始めた。微小突起は透明な細胞質より成り、媒精後約 75 秒 ( $75.2 \pm 5.4$  秒) で卵表面からの高さ  $2.4\ \mu\text{m}$ 、幅  $10\ \mu\text{m}$  の台形の突起に発達した。精子頭部のゼリー層中を進む速度は、 $0.13\ \mu\text{m}/\text{sec}$  ( $0.13 \pm 0.01\ \mu\text{m}/\text{sec}$ ) であり、ゼリー層中への侵入開始後約 55 秒 ( $54.5 \pm 7.1$  秒) で、精子頭部は卵表に新たに形成された受精丘表面に到達した。精子頭部は受精丘表面で約 22 秒 ( $22.3 \pm 2.3$  秒) 停止した後、 $0.11\ \mu\text{m}/\text{sec}$  ( $0.11 \pm 0.01\ \mu\text{m}/\text{sec}$ ) の速度で受精丘中へ侵入し、引き続いて卵表に突出していた尾部が短くなった。精子がゼリー層に接してから約 123 秒 ( $123.2 \pm 6.7$ ) で精子頭部の卵受精丘中への侵入は完了した。

精子頭部は、ゼリー層中への侵入を開始した後、一定速度で連続的に卵内へ侵入を続けるのではなく、媒精後約 75 秒から 97 秒までの約 22 秒間受精丘表面



に留まっていた。一方卵表面では、精子先体系が卵黄膜と接触した後に受精膜を形成し始めた。媒精後約 97 秒で精子頭部はこの受精膜をぬけ、卵表面に局所的に形成された受精丘中へ侵入した。この受精丘は、媒精後 10 分以内に消失した。

## 2. 走査型電子顕微鏡による精子侵入過程の観察

ビデオ撮影装置を用いたヒトデ精子侵入過程の観察より、精子頭部は受精膜をはさんで卵受精丘表面と接して一時停止した後に、受精膜をぬけて卵内へ侵入することが明らかになった。そこで、精子先体系の卵黄膜との接触と受精膜の上昇開始のタイミング、および精子頭部の受精膜通過機構に注目して、ヒトデ過熟卵への精子侵入過程を走査型電子顕微鏡により観察した。

本実験に用いた固定液（Janus green を含まず）では、卵ゼリー層は保存されない。ゼリー層の除かれたヒトデ未受精卵卵表には、規則正しい微絨毛の配列が観察された。媒精 30 秒後には精子は先体反応を起こし、先体系先端は卵黄膜へ到達していた。卵黄膜上では精子先体系の周囲から微絨毛の規則正しい配列が消失し、卵黄膜がしわ状になりながら上昇した。この時、先体系の先端は上昇する卵黄膜（受精膜）を通過していた（図 1-4A）。この部域より、微絨毛の配列は卵の全周にわたって消失して行き、卵表層では表層粒が崩壊してその内容物が卵黄膜を裏打ちすることにより受精膜が形成される（Holland, 1980）。媒精 60 秒後に、受精膜はほぼ全周に形成されているが、まだ精子頭部は上昇しつつある受精膜の外側に位置し、先体系先端は受精膜中へ侵入していた（図 1-4B）。媒精 90 秒後、精子頭部は受精膜と接し、この時卵由来と思われる樹状突起が伸長して精子頭部を包み込んでいた（図 1-4C）。媒精 120 秒後にこの突起は消失しており、同時に精子頭部も受精膜をぬけて卵内へ侵入していた。尾部の一部はまだ受精膜の外側に位置していた。（図 1-4D）。以上の観察より、精子先体系が

卵黄膜に到達した時点でこの部域より受精膜の上昇が開始すること、精子頭部が上昇しつつある受精膜を通過する時、卵表から樹状突起が受精膜の外側まで伸長して精子頭部を包み込み、この突起の退縮と同時に精子頭部は卵内へ引き込まれ、受精膜を通過することが明らかになった。

### 3. 透過型電子顕微鏡による精子侵入過程の観察

ヒトデ卵原形質膜および卵表層と精子との相互作用を見るために、透過型電子顕微鏡による観察を行った。媒精 30 秒後、精子の先体系は卵黄膜を通過し（図 1-5A）、卵原形質膜と融合していた。融合した先体系周囲の卵表層では、表層粒の崩壊が始まり、卵黄膜が卵原形質膜より離れ、受精膜を形成しつつあった。先体系先端が卵原形質と融合した部位の表層では、電子密度の高い微細な細胞質顆粒よりなる受精丘の形成が始まった（図 1-5B）。この部域には、ミトコンドリア、卵黄粒などの大きな細胞質顆粒は含まれていなかった。受精丘は、卵表を底面、卵の中心方向を頂点とした円錐形に発達し、この受精丘の高さは約  $10\ \mu\text{m}$ 、底面の半径は  $10\ \mu\text{m}$  であった。受精丘の側面部分には、卵表と卵中心を結ぶ方向に多数の繊維様構造が形成されるが、この繊維構造は、卵表に突出した受精丘部域中にも観察された（図 1-5C）。先体系は円錐形の底面中心部分から受精丘中に侵入し、媒精約 90 秒後に精子頭部は卵原形質膜と接した（図 1-5D）。続いて、受精丘を形成する細胞質（先体系基部が卵表と接する部域にある電子密度の高い細胞質）の一部が、受精膜の外側に位置する精子頭部周囲まで突出した（図 1-5D、inset）。この突出は媒精 90 秒前後のごく短い間のみ観察される。突出の消失（退縮）後は、精子頭部は受精丘中に侵入していた（図 1-5E）。媒精 180 分後、受精丘中へ侵入した精子は円錐形に発達した受精丘の最深部（頂点付近）に観察された（図 1-5F）。また、尾部の一部も受精丘中に侵入していた。

## 考察

### 精子侵入経過

本研究において、精子侵入過程に関与するヒトデ卵表のダイナミックな変化およびその微細形態を明らかにした。ビデオ撮影装置および透過型、走査型電子顕微鏡による観察より、ヒトデ卵への精子侵入は以下の過程により進行することが明らかになった。

1) 媒精後、精子は直ちに卵ゼリー層表面に到達し、約 20 秒間停止する。微細構造の観察より、ヒトデ精子は先体反応を起こし、先体糸はゼリー層、卵黄膜を通過し、卵原形質膜と接触、融合していた。2) 精子先体糸およびそれに続いて精子頭部はゼリー層を通過する。この時卵表面では、先体糸周囲より表層粒が崩壊し、受精膜が上昇し、卵の活性化が起こる。受精膜下の卵表層では、侵入する精子先体糸周囲に微細な細胞質顆粒が集合して受精丘が形成される。受精丘はこの後約 60 秒で、高さが約  $10\ \mu\text{m}$ 、底面半径  $10\ \mu\text{m}$  の円錐形状に発達する。3) 精子頭部は上昇しつつある受精膜をはさんで新たに形成された受精丘表面と接触し、再び約 20 秒間停止する。4) 精子頭部の受精丘表面での停止期に、受精丘細胞質の一部が樹状に伸長して受精膜の外側まで突出し、精子頭部を包み込む。5) この突出の退縮と同時に、精子頭部は受精膜を通過し受精丘中へ侵入する。以上の結果より、精子侵入部位に発達する受精丘が、精子頭部が受精膜をぬけて卵細胞質中へ侵入する過程と密接に関わっていることが明らかになった。

16 ミリカメラあるいはビデオカメラを用いたウニ卵への精子侵入過程の観察より、受精する精子が卵黄膜に到達してから、表層粒の崩壊、受精膜の上昇が開始するまで 30 秒から 1 分の静止期のあること、精子の卵内への侵入に先行して精子鞭毛運動の停止することが明らかにされている (Epel et al, 1977; Schatten and Schatten, 1980; Schatten, 1981)。本研究におけるヒトデ精子

侵入過程の観察も、基本的にはウニで行われてきた観察と一致している。一方、ウニの場合には精子先体突起が短いために、精子頭部の卵内への侵入に先体突起および精子頭部自身がどの様に関与しているのか明確に捉えることは難しい。ヒトデ卵における観察の結果は、精子を包み込もうとする卵表層の反応が精子先体糸に対してではなく、受精する精子頭部に対して起こることを示している。

#### 精子先体糸と卵表との相互作用

ヒトデ精子は鞭毛運動によりゼリー層表面に到達し、そこで先体反応を起こす (Dan, 1954; Colwin and Colwin, 1956; Ikadai and Hoshi, 1982)。精子は、頭部先端より先体糸をゼリー層中に侵入させる。精子先体糸の伸長は、ゼリー層と反応した後 1 ~ 2 秒で完了するので (Dan and Hagiwara, 1967)、精子頭部と卵黄膜との連絡は、精子頭部のゼリー層表面への到達後直ちに起こっているものと考えられる。精子頭部は先体糸で卵表面に結合した状態のまま約 20 秒間停止した後、卵内への侵入を再開する。この時、先体糸周囲より卵表面の微絨毛の規則的な配列が乱れ始める。ウニ卵の場合、媒精後 1 分以内に先ず受精する精子周囲の卵表で微絨毛の規則的な配列が乱れる。これは表層粒の崩壊に伴う卵黄膜の受精膜への変化である (Tegner and Epel, 1976)。ヒトデの場合も、透過型電子顕微鏡による観察より、先体糸周囲の表層粒が崩壊し、卵黄膜が卵原形質膜から離れることが確認された。即ち、表層粒の崩壊を伴う卵の付活は、精子先体糸先端が卵原形質膜と結合、または融合することで開始することが明らかになった。侵入する精子周囲の表層粒について、ウニ卵における観察では、受精する精子周囲の数ミクロンの範囲の表層粒の崩壊は起こらないとする報告 (Epel and Patton, 1985)、および受精する精子直下の表層粒を含めて、全ての表層粒が崩壊するとする報告がある (Longo *et al*, 1986)。本実験で用いたヒトデおよびイトマキヒトデの場合、融合した先体糸周囲の表層粒はすべて崩壊していた。

## 精子先体系の侵入と受精丘形成

精子先体系の卵内への侵入に伴い、先体系周囲に受精丘が発達してくる。この領域は、周囲の細胞質とは異なり、微細な細胞質顆粒から構成されている。精子侵入部位に受精丘が発達し、受精する精子がこの中へ侵入することは、環形動物 (Colwin and Colwin, 1961; 1963)、ウニ類 (Takashima and Takashima, 1960; Franklin, 1965; Longo and Anderson, 1968)、クモヒトデ類 (Yamashita, 1983) などでも観察されている。また受精丘中にアクチンフィラメントの存在することは、ウニ類 (Longo and Anderson, 1968; Tilney and Jaffe, 1980) およびユムシ (Tyler, 1965) でも報告されている。今回観察したヒトデ受精過程で発達する受精丘にも繊維様構造が観察された。ウニ卵の場合、受精丘は精子侵入が完了した後に発達し、アクチンフィラメントは受精丘中に侵入した精子頭部周囲で発達してくる (Longo and Anderson, 1968)。そこで受精丘は精子侵入過程よりもむしろ、卵内へ侵入した精子の反転に関与するものと考えられる (Schatten and Mazia, 1976; Longo, 1980)。一方ヒトデの場合、受精する精子の侵入部位直下に、精子頭部の卵内への侵入に先行して受精丘が形成されており、受精丘は精子先体系の侵入に関与している可能性が考えられる。受精丘は精子先体系を中心軸にして円錐形状に発達する。十分に発達した受精丘の高さは約  $10\ \mu\text{m}$  であり、これは受精する精子先体系の長さとはほぼ一致している。さらに精子頭部のゼリー層通過時にすでに尾部の運動が停止していることも、精子先体系および頭部の移動に先体系と受精丘が関与している可能性を支持する。ヒトデ精子先体系の中軸はアクチンフィラメントより形成されており (Schroeder and Christen, 1982)、先体系の収縮あるいは先体系の受精丘中への侵入に伴い精子頭部は受精丘表面へ接近すると考えられている。本研究の結果、先体系は受精丘中へ侵入すると同時に受精丘自体も卵表へ突出してくるこ

と、受精丘中の精子先体系と平行に繊維様構造が発達することが観察された。このことは、精子（先体系）侵入過程に、精子先体系のみでなく、受精丘およびその中に発達した繊維様構造も積極的な役割を担っている可能性を示唆する。

#### 精子頭部包み込み反応

精子先体系の卵内への侵入に引き続いて、卵表（卵受精丘表面）では精子頭部を包み込もうとする反応が現れる。受精時における卵表の精子を包み込もうとする反応は、ウニ卵あるいはハムスター卵でも観察される（第1章）。ウニ卵表におけるこの反応は、受精膜が上昇する以前に起こる。また、精子先体突起と卵表との接触と同時に進行する（Schatten and Mazia, 1976; Schatten and Schatten, 1980）。一方、ハムスター卵においては、精子は卵丘をぬけた後、卵表より伸長してきた微絨毛に捕捉される。その後、精子先体基部より膜融合が起こり精子は卵内へ侵入する（Gwatkin, 1976; Yanagimachi, 1988）。本実験において観察された精子頭部を包み込もうとする卵表の受容反応は、精子先体系と卵表との接触ではなく、精子頭部が卵表と接触した時点で誘起された。このことから、この精子頭部の包み込み反応を誘起する因子は、先体系ではなく精子頭部に存在するものと考えられる。ヒトデ精子は先体反応に伴い先体胞物質を放出する。ヒトデ精子先体胞物質は、先体系基部あるいは精子頭部周囲にも存在することが透過型電子顕微鏡により観察されている（Dan and Hagiwara, 1967）。精子頭部包み込み反応は、先体反応により放出された先体胞物質により誘起される可能性が示唆される。

本研究の結果、先体系の卵表への到達により卵の活性化が起こり、同時に受精丘が形成され、精子頭部が卵表に新たに形成された受精丘に取り込まれることが明らかになった。Fol（1877）が記載した迎接突起は新生された受精丘であると思われるので、卵由来の構造によって精子が卵に引き込まれるとした彼の推論

は、部分的には正しかったと見なすことが出来る。精子先体系は卵の付活に関与すると同時に、精子受容部位の形成（受精丘の発達と関連した）にも関与しているものと考えられる。

## 要約

ヒトデ過熟卵への精子侵入過程の経時変化およびその微細構造を顕微鏡ビデオ撮影装置および電子顕微鏡を用いて観察した。受精時に、精子は卵ゼリー層表面で先体反応を起こし、先体系を伸長する。先体系先端は卵原形質膜と融合する。この時、精子は鞭毛運動を停止する。先体系と卵の融合部の周りに、電子密度の高い顆粒を含む細胞質（透明細胞質）が集まり、受精丘に発達する。先体系が卵表に達してから、約 20 秒後に表層粒の崩壊が始まり、受精膜が上昇し始める。先体系の軸心に沿って形成された受精丘の細胞質は、卵表を底面に、卵中心方向を頂点にした円錐形に発達し、その一部は樹状突起となり受精膜の外側まで突出して精子頭部を包み込む。この状態で約 20 秒間停止した後、突起の退縮（卵への吸収）に伴って、精子核は受精膜を通過し、受精丘中に取り込まれる。ヒトデ精子の侵入過程は媒精 2 分前後で完了する。

以上の結果より、ヒトデ精子先体系が卵表に到達した後、先体系を中心に卵表には受精丘が形成されること、続いて受精丘表面による精子頭部包み込み反応により、精子頭部の卵内への侵入の起こることが明らかになった。



## 文献

- Chambers R. (1923): Studies on the organization of the starfish egg. J. Gen. Phys. 5: 821-829.
- Chambers R. (1930): The manner of sperm entry in the starfish egg. Biol. Bull. 58: 344-369.
- Colwin L.H. and Colwin A.L. (1956): The acrosome filament and sperm entry in Thyone briareus (Holothuria) and Asterias. Biol. Bull. 110: 243-257.
- Colwin L.H. and Colwin A.L. (1961): Changes in the spermatozoon during fertilization in Hydroides hexagonus (Annelida). II. Incorporation with the egg. J. Biophys. Biochem. Cytol. 10: 255-274.
- Colwin L.H. and Colwin A.L. (1963): Role of the gamete membranes in fertilization in Saccoglossus kowalevskii (Enteropneusta). II. Zygote formation by gamete membrane fusion. J. Cell Biol. 19: 501-518.
- Dan J.C. (1950): Sperm entrance in echinoderms, observed with the phase contrast microscope. Biol. Bull. 99: 399-411.
- Dan J.C. (1954): Studies on the acrosome. II. Acrosome reaction in starfish spermatozoa. Biol. Bull. 107: 203-218.
- Dan J.C. and Hagiwara Y. (1967): Studies on the acrosome. IX. Course of acrosome reaction in starfish. J. Ultrastruct. Res. 18: 562-579.
- Epel D., Cross N.L. and Epel N. (1977): Flagellar motility is not involved in the incorporation of the sperm into the egg at fertilization. Develop. Growth and Differ. 19: 15-21.

- Epel D. and Patton C. (1985): Cortical granules of sea urchin eggs do not undergo exocytosis at the site of sperm-egg fusion. *Develop. Growth and Differ.* 27: 361-369.
- Fol H. (1877): Sur le commencement de l'hénogenie chez divers animaux. *Arch. Zool. exp. gén.* 6: 145-169.
- Fujimori T. and Hirai S. (1979): Differences in starfish oocyte susceptibility to polyspermy during the course of maturation. *Biol. Bull.* 157: 249-257.
- Franklin L. (1965): Morphology of gamete membrane fusion and of sperm entry into oocytes of the sea urchin. *J. Cell Biol.* 25: 81-100.
- Gwatkin R.B.L. (1976): Fertilization. In Poste G. and Nicolson G.L. (eds): "The Cell Surface in Animal Embryogenesis and Development.", North-Holland Pub., Amsterdam, pp. 1-54.
- Hirai S., Nagahama Y., Kishimoto T., and Kanatani H. (1981): Cytoplasmic maturity revealed by the structural changes in incorporated spermatozoon during the course of starfish oocyte maturation. *Develop. Growth and Differ.* 23: 465-478.
- Holland N.D. (1980): Electron microscopic study of the cortical reaction in eggs of the starfish (Patiria miniate). *Cell Tissue Res.* 205: 67-77.
- Ikadai H. and Hoshi M. (1982): Biochemical studies on the acrosome reaction of the starfish, Asterias amurensis. I. Factors participating in the acrosome reaction. *Develop. Growth and Differ.* 23: 73-80.
- Kanatani H. (1969): Induction of spawning and oocyte maturation by

- 1-methyladenine in starfish. Exp. Cell Res. 57: 333-337.
- Longo F.J. and Anderson E. (1968): The fine structure of pronuclear development and fusion in the sea urchin, Arbacia puncturata. J. Cell Biol. 39: 339-368.
- Longo F.J. (1980): Organization of microfilaments in sea urchin (Arbacia puncturata) eggs at fertilization: Effect of cytochalasin B. Develop. Biol. 74: 422-433.
- Longo F.J., Lynn J.W., McCulloh D.H., and Chambers E.L. (1986): Correlative ultrastructural and electrophysiological studies of sperm egg interactions of sea urchin, Lytechinus variegatus. Develop. Biol. 118: 155-166.
- Miyazaki S. and Hirai S. (1979): Fast polyspermy block and activation potential. Correlated changes during oocyte maturation of a starfish. Develop. Biol. 70: 327-340.
- Schatten G. and Mazia D. (1976): The penetration of the spermatozoon through the sea urchin egg surface at fertilization. Observations from the outside on whole eggs and from the inside on isolated surfaces. Exp. Cell Res. 98: 325-337.
- Schatten H. and Schatten G. (1980): Surfaces activity at the egg plasma membrane during sperm incorporation and its cytochalasin B sensitivity. Scanning electron microscopy and time-lapse video microscopy during fertilization of sea urchin Lytechinus variegatus. Develop. Biol. 78: 435-449.
- Schatten G. (1981): The movement and fusion of the pronuclei at fertilization of the sea urchin Lytechinus variegatus: Time lapse

- video microscopy. J. Morphol. 167; 231-247.
- Schroeder T.E. and Christen R. (1982): Polymerization of actin without acrosomal exocytosis in starfish sperm. Visualization with NBD-phalloidin. Exp. Cell Res. 140: 363-371.
- Takashima R. and Takashima T. (1960): Electron microscope observations on the fertilization phenomenon of sea urchin with special reference to the acrosome filament. Tokushima J. Exp. Med. 6: 334-340.
- Tegner M.J. and Epel D. (1976): Scanning electron microscope studied of sea urchin fertilization. 1. Eggs with vitelline layers. J. Exp. Zool. 197: 31-58.
- Tilney L.G. and Jaffe L.A. (1980): Actin, microvilli and fertilization cone of sea urchin eggs. J. Cell Biol. 87: 771-782.
- Yamashita M. (1983): Electron microscopic observations during mono-spermic fertilization process of the brittle-star Amphipholis kochii Lutken. J. Exp. Zool. 228: 109-120.
- Yanagimachi R. (1988): Sperm-egg fusion. Curr. Top. Membr. Transp. 32: 3-42.

### 第3章 精子侵入過程におけるマイクロフィラメント系の関与

#### 序論

ウニ卵の受精過程で、精子尾部の鞭毛運動は卵内へ侵入する時点ですでに停止している (Epel *et al*, 1977)。また、尾部を切断されて運動性を失った精子頭部も卵を受精させる (Vacquier, 1979)。このことより、精子頭部の卵細胞質内への侵入は、精子の鞭毛運動によるのではなく、卵と精子の相互作用あるいは卵側の精子を迎え入れる機能によると考えられる。

ウニ卵表層にはアクチン (Miki-Noumura and Kondo, 1970) およびミオシン (Mabuchi, 1973) が存在する。Cytochalasin B はアクチンあるいはアクトミオシン系の機能を阻害する (Spudich and Lin, 1972; Spudich, 1973)。この cytochalasin B を卵に作用させると精子侵入が抑制されることから (Longo, 1978; Byrd and Perry, 1980; Schatten and Schatten, 1980)、卵内への精子侵入にはアクチンフィラメントの関与した運動系の関与している可能性が示唆される。

ヒトデの精子侵入過程では、先ず精子先体系が形成されつつある受精丘中に侵入し、続いて精子頭部が受精丘表面に包み込まれる (第2章)。ヒトデ精子先体系の軸芯はアクチンフィラメントより構成されていること (Schroeder and Christen, 1982)、またヒトデ未受精卵表層にはにはアクチンフィラメントの存在することが報告されている (Schroeder and Stricker, 1983)。本章では、前章の透過型電子顕微鏡観察においてヒトデ卵受精丘中にみられた繊維様構造がアクチンフィラメントであるかどうか、またこの構造が精子受容に関与しているかどうかを検討した。

Phalloidin は F- アクチンと特異的に結合してこれを安定化する。一方、G- アクチンとは結合できず、G- アクチンに対して重合を促進させる効果もない。

蛍光分子 7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazole (NBD) を結合した NBD-phalloacidin を用いることにより、細胞内におけるアクチンフィラメントの分布を特異的に調べることができる (Barak *et al*, 1980)。そこで、精子の侵入中の卵を NBD-phalloacidin で蛍光染色し、精子侵入部位卵表層のアクチンフィラメントの分布およびその配向を観察した。さらに、cytochalasin B を用いて、アクチンフィラメントの形成を阻害した場合の精子侵入に及ぼす影響を調べた。

#### 材料と方法

材料・・・材料はヒトデ (*Asterias amurensis*) およびイトマキヒトデ (*Asterina pectinifera*) を用いた。基本的な材料の取扱いは、第2章に準じた。

NBD-phalloacidin による蛍光染色・・・精子侵入過程に関与するアクチンフィラメントを観察するため NBD-phalloacidin (Wako Pure Chemical Co.)、および精子核を検出するために DNA と特異的に結合してこれを染色する蛍光物質、4,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI、Sigma Chemical Co.) を用いて、受精卵の蛍光染色を行った。1-methyladenine 処理後 170 分の減数分裂を完了したイトマキヒトデ過熟卵を媒精後 10 分まで一定間隔で固定した。固定は 14.8 % formalin- $\text{Ca}^{2+}$ - 欠如海水 (1 mM EGTA を含む, pH 7.0) で、10 分間行った。固定卵を  $\text{Ca}^{2+}$ - 欠如海水で洗った後、予め 1% poly-L-lysine (Sigma Chemical Co.) で覆ったカバーガラス上に滴下し貼付けた。このカバーガラス上に染色液 40  $\mu\text{l}$  を滴下し室温で 30 分以上染色を行った。染色液は Schroeder and Stricker (1983) がヒトデ卵表層の細胞骨格染色に用いた溶液に DAPI を加えたものであり、0.15  $\mu\text{g/ml}$  NBD-phalloacidin、0.1  $\mu\text{g/ml}$

DAPI、50  $\mu\text{g/ml}$  palmitoyl lysolecitin (Sigma Chemical Co.) を含む  $\text{Ca}^{2+}$ - 欠如海水である。染色後、試料を  $\text{Ca}^{2+}$ - 欠如海水で洗い、90% glycerin- $\text{Ca}^{2+}$ - 欠如海水に封入し、蛍光顕微鏡 (OPTIPHOTO、落射蛍光装置 EF、Nikon) で観察した。

受精丘の形成過程を卵表層の内側から観察するために、卵表層の単離を行った。媒精後、直ちに卵を 1% sodium tioglycellate 海水 (pH 10.0) で 2 回洗い、卵黄膜を除去した。濾過海水で洗った後、卵黄膜の除去された裸卵を、1% poly-L-lysine で覆ったカバーグラス上に滴下し貼付けた。卵を貼付けたカバーグラスを  $\text{Ca}^{2+}$ - 欠如海水で洗った後、これに卵表層単離溶液を吹きつけ、卵細胞質を除去した。卵表層単離溶液は、0.5 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF)、0.2 mM dithiothreitol (DTT)、2 mM ethyleneglycol-bis-( $\beta$ -aminoethyl ether)-N,N,N',N'-tetraacetic Acid (EGTA)、0.2% Triton X-100 を含む  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ - 欠如海水 (pH 6.9) である。カバーグラス上に残った卵表層は、Triton X-100 を除いてある上述の表層単離溶液で洗い、5% formalin- $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ - 欠如海水で 5 分間固定し、NBD-phalloidin で 15 分間染色した後、glycerin で封入し、蛍光顕微鏡で観察した。

Cytochalasin B 処理 . . . 減数分裂を完了したヒトデ過熟卵を 0.1  $\mu\text{M}$  ~ 3.3  $\mu\text{M}$  cytochalasin B 海水 (cytochalasin B、Ardrich、を 1 mM となるように dimethyl sulfoxide (DMSO) に溶かしたものを保存液として、使用時に海水で希釈) で 10 分間前処理した後、それぞれの濃度の cytochalasin B 海水中で、最終濃度が  $10^{-3}$  dry sperm となるように媒精した。対照は cytochalasin B 海水のかわりに  $3.3 \times 10^{-3}\%$  DMSO 海水中で媒精した。これは、3.3  $\mu\text{M}$  cytochalasin B 海水中と同じ DMSO 濃度である。同時に、あらかじめ濾過海水中で最終濃度  $10^{-3}$  dry sperm となるように媒精した卵を、5 分後に 0.1 ~ 3.3  $\mu\text{M}$  cytochalasin B 海水中に移してインキュベートした。対照

として、媒精後の卵の一部を cytochalasin B 海水の代わりに、 $3.3 \times 10^{-3}\%$  DMSO 海水中へ移してインキュベートした。受精成立の判定のため、約 300 個の卵で媒精直後の受精膜形成および対照卵が第二卵割を行った時点での核分裂進行の有無を調べた。

電子顕微鏡用試料の作製・・・ヒトデ過熟卵を、 $1 \mu\text{M}$  cytochalasin B 海水中に 10 分間インキュベートした。そのまま cytochalasin B 海水中で媒精し 10 分後に 2 % glutaraldehyde 海水 (0.25 M saccharose、0.05 % Janus green を含む) で 45 分間前固定を行った。濾過海水で 3 回にわたり 60 分間洗った後、試料を 1 % osmium tetroxide 海水で 60 分間後固定した。固定試料を蒸留水で洗った後、アセトンシリーズで脱水し、Spurr 樹脂に包埋した。ウルトラトーム (Porter-Blum MT-1) で作成した超薄切片を、uranyl acetate および lead citrate で 2 重染色した後、透過型電子顕微鏡 (JEM T-8) で観察した。また cytochalasin B 海水処理卵の一部を、glutaraldehyde 海水、osmium tetroxide 海水で二重固定後、エタノールシリーズで脱水し、液体炭酸ガスで置換した後、臨界点乾燥装置 (日立 CPD-1) で乾燥した。さらに金を蒸着した試料を、走査型電子顕微鏡 (日立-明石 MINISEM-4) で観察した。

## 結果

### 1. NBD-phalloidin および DAPI による精子侵入過程の観察

媒精 1 分後、精子は先体系で卵表に結合しているが、頭部は卵表から離れた位置にあった。NBD-phalloidin 染色により、先体系は強い蛍光を発した。この蛍光は、精子の頭部先端から卵表に垂直に、卵表層中まで見られるので先体系の先端部分はすでに卵表層まで入っているものと推定される。卵表層では、先体系周



図の直径 2 ～ 3  $\mu\text{m}$  の範囲で強い蛍光が観察された。単離表層により精子侵入を卵の内側から観察した場合、受精卵表層の全域にわたって網目 (mesh-work) 状の蛍光が出現した。これは、Vacquier (1975) がウニ卵単離表層を走査型電子顕微鏡を用いて観察した時に出現した、表層アクチンフィラメントのネットワークに相当するものと推定される。強い蛍光を持った精子先体系が表層と垂直方向に観察され、表層と交わる部域では、この先体系を中心とした、蛍光部域が存在した。この構造は、先体系周囲に発達しつつある受精丘に対応するものと考えられた (図 2-1A)。

媒精 1.5 分後、精子頭部は卵表に形成された受精丘表面に到達していた。精子頭部先端から卵中心方向に、強い蛍光を発する長さ 12 ～ 13  $\mu\text{m}$  の先体系が観察され、さらにこの先体系の卵求心端を頂点に、三角形 (円錐形) 状の蛍光域が観察された。卵表付近では先体系を中心に、直径約 10  $\mu\text{m}$  の範囲で蛍光が観察され、一部は精子頭部周囲にまで回り込んでいた。単離表層においても卵表と垂直に先体系が内方に伸張しており、その周囲でも蛍光が観察された (図 2-1B)。しかし、中心の繊維は太く明瞭であるが、それ以外は明確な繊維構造を示さなかった。

媒精 2 分後、精子頭部は既に受精丘中に侵入しており、円錐形状の受精丘側面に沿って強い蛍光を示す繊維構造 (周辺繊維) が多数形成され、受精丘部域の蛍光は全体として増大し、周辺繊維の先端は卵表に突出していた。単離表層においても、表層に垂直方向の多数の繊維構造の集合域が観察された (図 2-1C)。

媒精 3 分後に、精子頭部は受精丘の最深部に達したが、三角形 (円錐形) の蛍光部域は保持されていた。単離表層においても、表層と卵中心を結ぶ方向に多数の繊維が発達したが、先体系に相当する受精丘中心を貫く太い中心繊維は消失していた (図 2-1D)。

この後、強い蛍光を持った部域は卵内部から消失するが、媒精 5 分で、精子頭

部後方の精子尾部に相当する部域で NBD-phalloidin 染色による強い蛍光が見られ、卵細胞質の外側まで突出していた（図 2-1E）。

媒精 7 分から 10 分で、蛍光部域は卵表の突出として残り、受精丘はなお卵表上に突出しているが、明瞭な繊維構造は見られなかった（図 2-1F）。

## 2. Cytochalasin B の精子侵入に与える影響

ヒトデ精子侵入時に、卵表では先体系周辺に NBD-phalloidin で染色される繊維構造が出現することから、精子の卵細胞質内への侵入と同時に、侵入部の卵表層にアクチンフィラメントが発達してくるものと推定される。そこで、アクチンフィラメントの伸長を阻害する cytochalasin B の精子侵入におよぼす影響を検討した。

ヒトデ過熟卵を  $0.1 \mu\text{M} \sim 3.3 \mu\text{M}$  の cytochalasin B を含む海水（cytochalasin B 海水）中で 10 分間インキュベートした後、それぞれの濃度の cytochalasin B 海水中で媒精し、そのままインキュベートした（図 2-2）。正常受精卵が 2 細胞期になる媒精 1.5 時間後に観察したところ、細胞質分裂は  $0.33 \mu\text{M}$  以上の濃度の cytochalasin B 海水中で抑制され、 $0.67 \mu\text{M}$  cytochalasin B 海水中では核分裂も 50 % 阻害された。しかし、この濃度の cytochalasin B 海水中では受精膜は正常に上昇した。核分裂および受精膜形成率は、cytochalasin B 濃度が高くなるのに伴って減少し、核分裂は  $1 \mu\text{M}$  cytochalasin B 海水で、受精膜形成は  $3.3 \mu\text{M}$  cytochalasin B 海水中でほぼ完全に抑制された。 $1 \mu\text{M}$  cytochalasin B 海水中で媒精した場合には、受精膜は上昇するが核は単核のまま留まり（図 2-3B）、また、 $3.3 \mu\text{M}$  cytochalasin B 海水中で媒精した場合には、受精膜は上昇せず、核も単核のまま留まっていた（図 2-3C）。ヒトデ過熟卵は、 $1 \mu\text{M}$  cytochalasin B 海水中に入れ媒精を行わない時には、雌性前核の卵中央への移動（センターリング）を起こすが、前核

は単核のまま留まり核分裂は起こさなかった（図 2-3A）。海水中で媒精し、5 分後に、各々の濃度の cytochalasin B 海水中に入れたヒトデ過熟卵は、0.33  $\mu$  M 以上の濃度の cytochalasin B 海水中では細胞質分裂を抑制されたが、海水中に置いたままの対照卵の細胞分裂に同調して、核分裂を進行し、多核となった（図 2-4A,B,C）。

1  $\mu$  M cytochalasin B 海水中で媒精され、単核で留まっている卵を電子顕微鏡で観察した（図 2-5）。精子は先体反応を起こしており、先体系を受精膜中に侵入させていたが、卵表に留まっていた（図 2-5, inset）。先体系先端は卵原形質膜と融合し、表層粒の崩壊が始まっていた。精子先体系の融合部に、微細な細胞質顆粒を含む卵細胞質が集積していた。この細胞質の一部は、先体系に沿って受精膜付近にまで上昇していたが卵中心方向を頂点とした円錐形状には発達せず、その中には繊維様構造も観察されなかった。精子はこの状態で卵表に留まっており、卵の内部に侵入している精子先体系あるいは精核は観察されなかった。

### 考察

Cytochalasin B による精子侵入の抑制の結果は、図 2-6 のようにまとめられる。減数分裂の完了したヒトデ過熟卵を海水中で媒精した後、1  $\mu$  M もしくは 3.3  $\mu$  M cytochalasin B 海水中に入れると細胞質分裂は抑制され核分裂のみが進行する。1  $\mu$  M cytochalasin B 海水中で媒精した場合には、受精膜は上昇するが、細胞質分裂と核分裂が共に抑制された。しかし、3.3  $\mu$  M cytochalasin B 海水中で媒精した場合には、受精膜形成も起こらなかった。

ウニ卵やユムシ卵においては、細胞質分裂の抑制される濃度の cytochalasin B 海水中であっても、精子が既に侵入している場合は、精核の移動、前核形成が起

こり、核分裂は進行する（Gould-Somero *et al*, 1977; Longo, 1980）。cytochalasin B は卵内へ侵入した精子オルガネラの機能を抑制しないと考えられている（Schatten and Schatten, 1981）。ヒトデ卵の場合も、卵内へ侵入した精子核の前核形成、移動、雌性前核との融合過程、および核分裂は、実験に用いた範囲の濃度においては cytochalasin B による阻害を受けないものと判断される。先体系の形成は、アクチンの重合により引き起こされる（Tilney *et al*, 1973; Tilney *et al*, 1978; Tilney and Kallenbach, 1979）。しかし、先体反応に伴う先体系の形成は、cytochalasin B によって阻害されない（Sanger and Sanger, 1975）。ヒトデ精子の場合も、先体系の形成は cytochalasin B 海水中でも起こっていた。1  $\mu$ M 以上の濃度の cytochalasin B 海水中で媒精した時に受精が成立せずに卵が単核で留ったのは、精子の先体系が卵表と融合するにも関わらず、精子の卵内への侵入が起こらなかったためと考えられる。

精子先体系先端が卵原形質膜と融合した後、融合部の周りに受精丘が形成されてくる。ヒトデ受精丘は、まず電子密度の高い微細な細胞質顆粒が集合して形成され、この中に、アクチンフィラメントが現れ、受精丘は先体系を中心にして底面を卵表面、頂点を卵の求心方向とした円錐形状に発達する。この受精丘の発達および消失はアクチンフィラメントの発達および消失と平行関係にある。また、cytochalasin B 海水中で媒精した時、細胞質顆粒の集合は起きるが、アクチンフィラメントは出現せず、受精丘は円錐形状に発達しない。受精直後に cytochalasin B 海水中に移されたウニ卵では、受精丘のアクチンフィラメントが消失し、受精丘の形が崩れる（Longo, 1980）。ヒトデ受精丘中に出現するアクチンフィラメントは、受精丘の円錐形状の発達に関与していると考えられる。

Cytochalasin B 海水中では、アクチンフィラメントの出現しない不完全な受精丘が形成され、この場合ヒトデ精子先体系の受精丘中への侵入は起こらない。受精丘中のアクチンフィラメントは、先体系の受容と密接に関連しているものと

思われる。ミオシンサブフラグメント-1を結合させた観察より、ヒトデ精子先体系のアクチンフィラメントは、精子頭部側への方向性を持って規則正しく配列していることが知られている (Tilney and Kallenbach, 1979)。一方、ウニ卵受精丘中には、卵表と卵中心とを結ぶ方向に、アクチンフィラメントが観察されている (Longo, 1980)。これらのアクチンフィラメントの方向性は、全て卵中心方向を向いている (Tilney and Jaffe, 1980)。ヒトデ卵受精丘中のアクチンフィラメントの方向性は、現在のところまだ明らかではないが、ウニ卵と同様であるとすれば、精子先体系の卵内への侵入は、筋肉モデルで用いられているアクトミオシン系のスライディング機構では逆方向 (卵から離れる方向) にスライディングすることになり説明できない (Tilney and Kallenbach, 1979; Vacquier, 1981)。

アクチンフィラメントの脱重合を抑制する phalloidin あるいは phalloidin を含む海水中でウニ卵を媒精した時、受精丘中への精子侵入は抑制されない (Hamaguchi and Mabuchi 1982; Schatten and Schatten, 1981)。この時、受精丘は通常よりも大きく発達し、この中に精子を引き込む方向の細胞質顆粒の『流れ』のあることが観察されている (Schatten, 1982)。粘菌における細胞質の動きは、G-アクチン、F-アクチンの転換によって起こるアクチンフィラメントの形成、消滅に依存している (Isenberg and Wohlfarth-Bottermann, 1976)。また、この細胞質運動は  $\text{Ca}^{2+}$  により調節されている (Ridgway and Durham, 1976)。受精時にも、精子侵入部位において、最初の  $\text{Ca}^{2+}$  の遊離が起こる (Epel, 1978; Elisen and Reynolds, 1985; Hafner et al, 1988)。この遊離  $\text{Ca}^{2+}$  およびアクチンフィラメントの動態が、受精丘中の細胞質の動きと密接に関与している可能性が考えられる。

ヒトデ精子侵入過程においては、アクチンの関与した細胞質運動により先体系周囲に受精丘が発達し、受精丘表面が精子頭部と接触した時に、精子頭部を包み

込み、これを受精丘中に引き込むのであろう。

## 要約

受精時にヒトデ精子は、卵表に新たに形成される受精丘中へ侵入する。F- アクチンと親和性の高い NBD-phalloidin によりこの過程を蛍光染色によって観察した。卵内へ侵入しつつある精子先体系の周囲にアクチンフィラメントが発達し、円錐形状の受精丘が形成される。cytochalasin B 海水中で媒精すると、精子は先体反応を起こし、先体系先端は卵黄膜をぬけて卵原形質膜（卵表）と融合する。一方卵表層では、先体突起の融合部へ向かう微細な細胞質顆粒の移動（集合）は見られるが、この領域にアクチンフィラメントは出現せず、円錐形状の受精丘の発達も観察されなかった。先体系は受精丘中に侵入せず、精子頭部は受精膜の外側に留まる。

このことは、精子先体系および精子頭部の卵細胞質内への侵入には、受精丘の発達が必要であり、この発達にはアクチンフィラメントの関与する細胞質の運動性が重要であることを示唆する。

## 文献

- Barak L.S., Yocum R.R., Nothnagel E.A., and Webb W.W. (1980): Fluorescence staining of the actin cytoskeleton in living cells with 7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazole phalloidin. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77: 980-984.
- Byrd W. and Perry G. (1980): Cytochalasin B blocks sperm incorporation but allows activation of the sea urchin egg. Exp. Cell Res. 126: 333-342.
- Elisen A. and Reynolds G.T. (1985): Source and sink for the calcium released during fertilization of single sea urchin eggs. J. Cell Biol. 100: 1522-1527.
- Epel D., Cross N.L. and Epel N. (1977): Flagellar motility is not involved in the incorporation of the sperm into the egg at fertilization. Develop. Growth and Differ. 19: 15-21.
- Epel D. (1978): Mechanisms of activation of sperm and egg during fertilization of sea urchin gametes. Curr. Top. Develop. Biol. 12: 185-246.
- Gould-Somero M., Holland L., and Paul M. (1977): Cytochalasin B inhibits sperm penetration into eggs of Urechis caupo (Echiura). Develop. Biol. 58: 11-22.
- Hafner M., Petzelt C., Nobiling R., Pawley J.B., Kramp D., and Schatten G. (1988): Wave of free calcium at fertilization in the sea urchin egg visualized with fura-2. Cell Motility Cytoskel. 9: 271-277.
- Hamaguchi Y. and Mabuchi I. (1982): Effects of phalloidin microinjection and localization of fluorescein-labeled phalloidin in living sand



- dollar eggs. Cell Motility 2: 103-113.
- Isenberg G. and Wohlfarth-Bottermann K.E. (1976): Cytoplasmic actomyosin fibrils in tissue culture cells. Cell Tissue Res. 166: 427-443.
- Longo F.J. (1978): Effects of cytochalasin B on sperm-egg interactions. Develop. Biol. 67: 249-265.
- Longo F.J. (1980): Organization of microfilaments in sea urchin (Arbacia puncturata) eggs at fertilization: Effect of cytochalasin B. Develop. Biol. 74: 422-433.
- Mabuchi I. (1973): A myosin-like protein in the cortical layer of the sea urchin egg. J. Cell Biol. 59: 542-547.
- Miki-Noumura T. and Kondo H. (1970): Polymerization of actin from sea urchin eggs. Exp. Cell Res. 61: 31-41.
- Ridgway E.B. and Durham A.C.H. (1976): Oscillations of calcium ion concentration in Physarum polycephalum. J. Cell Biol. 69: 223-226.
- Sanger J.W. and Sanger J.M. (1975): Polymerization of sperm actin in the presense of cytochalasin-B. J. Exp. Zool. 193: 441-447.
- Schatten H. and Schatten G. (1980): Surface activity at the egg plasma membrane during sperm incorporation and its cytochalasin B sensitivity. Develop. Biol. 78: 435-449.
- Schatten G. and Schatten H. (1981): Effects of motility inhibitors during sea urchin fertilization. Microfilament inhibitors prevent sperm incorporation and restructuring of fertilized egg cortex, whereas microtubule inhibitors prevent pronuclear migrations. Exp. Cell

- Res. 135: 311-330.
- Schatten G. (1982): Motility during fertilization. In Bourne G.H. and Danielli J.F. (eds): "International Review of Cytology. Vol. 79.", Academic Press, New York, pp. 59-163.
- Schroeder T.E. and Christen R. (1982): Polymerization of actin without acrosomal exocytosis in starfish sperm. Visualization with NBD-phalloidin. *Exp. Cell Res.* 140: 363-371.
- Schroeder T.E. and Stricker S.A. (1983): Morphological changes during maturation of starfish oocytes: Surface ultrastructure and cortical actin. *Develop. Biol.* 98: 373-384.
- Spudich J.A. and Lin S. (1972): Cytochalasin B, its interaction with actin and actomyosin from muscle. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 69: 442-446.
- Spudich J.A. (1973): Effects of cytochalasin B on actin filaments. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 37: 585-593.
- Tilney L.G., Hatano S., Ishikawa H., and Mooseker M. (1973): The polymerization of actin: its role in the generation of the acrosomal process of certain echinoderm sperm. *J. Cell Biol.* 59: 109-126.
- Tilney L.G., Kiehart D., Sardet C., and Tilney M. (1978): The polymerization of actin. IV. The role of  $\text{Ca}^{2+}$  and  $\text{H}^+$  in the assembly of actin and in membrane fusion in the acrosomal reaction of echinoderm sperm. *J. Cell Biol.* 77: 536-550.
- Tilney L.G., Kallenbach N. (1979): Polymerization of actin. VI. The polarity of the actin filaments in the acrosomal process and how

- it might be determined. J. Cell Biol. 81: 608-624.
- Tilney L.G., Jaffe L.A. (1980): Actin, microvilli, and the fertilization cone of sea urchin eggs. J. Cell Biol. 87: 771-782.
- Vacquier V.D. (1975): The isolation of intact cortical granules from sea urchin eggs: Calcium ions trigger granule discharge. Develop. Biol. 43: 62-74.
- Vacquier V.D. (1979): The fertilizing capacity of sea urchin sperm rapidly decreased after induction of the acrosome reaction. Develop. Growth and Differ. 21: 61-69.
- Vacquier V.D. (1981): Dynamic changes of the egg cortex. Develop. Biol. 84: 1-26.

## 第4章 精子頭部包み込み反応に関する解析

### 第1節 先体系切断精子に対するヒトデ卵表の受容反応

#### 序論

イトマキヒトデ精子とキタムラサキウニ卵の交雑組合せにおいて、あらかじめ卵海水処理により先体反応を誘起した精子を、ゼリー層と卵黄膜を除去したウニの裸卵に媒精すると、精子先体系と卵原形質膜との融合は起こらずに、精子頭部は裸卵の表面に形成された細胞質突起に包み込まれる。この時、表層粒の崩壊など、卵の付活の兆候はみられない。この卵表の精子頭部に対する反応（精子頭部包み込み反応、sperm-engulfing response）は、先体反応誘起直後の、まだ受精能を保持している精子の頭部に対してのみ誘起されること、さらにウニ卵の受精過程において卵表の微絨毛が受精する精子を包み込む反応と形態的に類似していることから、正常な受精過程の一部を反映しているものと考えた（Kyo-zuka and Osanai, 1988）。

ヒトデの正常な受精過程では、精子は、まず先体反応を起こして先体系の先端で卵原形質膜と融合し、ついで先体系を軸にして発達した受精丘の頂部の突起によってその頭部を包み込まれる。上述のウニ卵表によるヒトデ精子頭部包み込み反応が、正常な受精過程での精子侵入機構の一部（頭部の包み込み）を反映しているものであるなら、先体系を除去して先体系による膜融合が起こらないようにしてやれば、同種の卵と精子の間でも同様な精子頭部包み込み反応だけが起こることが期待できる。そこで、先体反応誘起直後に、ヒトデ精子から先体系を切除し、精子頭部を単離することを試み、さらに、単離した精子頭部に対するヒトデ卵表の反応を観察した。

## 材料と方法

材料・・・イトマキヒトデ (*Asterina pectinifera*) は、9 月初旬に浅虫臨海実験所周辺で採集し、流海水中で飼育した。十分に発達した卵巣より卵母細胞を海水中に絞り出した。Ca<sup>2+</sup>- 欠如海水 (CaFSW) で洗い、濾胞細胞を除去した後、これらを海水中に戻し、1- methyladenine (1  $\mu$ M) を加えて減数分裂を誘起した。実験には第二極体を放出し減数分裂の完了した過熟卵を用いた。卵海水の調製およびゼリー層、卵黄膜の除去は、pronase-acid sea water 法 (Kyojuka and Osanai, 1984) により行った。

精子先体糸の切断・・・10 ml の試験管に 2 ml の精子懸濁液 (精子濃度  $3.8 \times 10^8$ /ml) をとり 10 秒間ウルトラディスペーサー (ヤマト LK-21 型) 処理を行った。ウルトラディスペーサーは、高速回転する刃により、溶液中の懸濁物を数秒間のうちに 2 ~ 3  $\mu$ m に細断する。ディスペーサー処理後、精子懸濁液を直ちに 2500 g で 30 秒間遠心し、精子頭部を沈澱させ、上澄み液中に懸濁している精子尾部の切断片を除去した。再び 2 ml となるように海水を加えたものを未反応 (先体反応を起こしていない、まだ先体胞を保持している) 精子頭部懸濁液として媒精に用いた。10 ml の試験管に 1.5 ml の精子懸濁液 (精子濃度  $3.8 \times 10^8$ /ml) を取り、これに 0.5 ml 卵海水を加えて先体反応を誘起した後、上記と同様のウルトラディスペーサー処理および遠心を行った。得られた沈澱を、最終的に 2 ml に希釈したものを反応 (先体反応誘起後の) 精子頭部懸濁液として、以下の実験に用いた。

媒精・・・0.9 ml の海水に 10  $\mu$ l のパックになった卵を加えさらに未反応あるいは反応後の精子頭部懸濁液を 100  $\mu$ l 加えた。対照には、ウルトラディスペーサー処理を行っていない先体反応誘起前あるいは誘起後の精子を用いた。尾部の切断された精子頭部は運動性を持たないため、よく攪拌して接触確率を高めた。攪拌は、同一の条件下でディスペーサー処理を行った未反応精子頭部がヒトデ卵

をほぼ 100 % 受精させ、受精膜上昇が観察されるまで行い、この時間はおよそ 3 分間であった。各々約 300 個の卵の受精膜形成および核分裂の進行の有無により受精率を算出した。

電子顕微鏡用試料・・・ウルトラディスパーサー処理前および後の精子懸濁液を 1 % poly-L-lysine (Sigma Chemical Co.) を塗ったカバーガラス上に滴下した。カバーガラスを海水で洗い、貼付いていない余分な精子を除去した。精子あるいは精子頭部の接着したカバーガラスを、1% glutaraldehyde 海水で 15 分間固定した後、エタノールシリーズで脱水した。液体二酸化炭素で置換した試料を、臨界点乾燥し、金を蒸着した後、走査型電子顕微鏡 (日立明石 MINISEM-4) で観察した。精子頭部と卵表との反応を観察するため、卵を媒精 30 分後に 1% glutaraldehyde 海水で 30 分間前固定し、引き続いて、60 分間海水で洗い、1 % osmium tetroxide 海水で 45 分間後固定した。0.5% uranyl acetate で一晩ブロック染色を行った試料を、アセトンシリーズで脱水した後 Spurr 樹脂に包埋した。超薄切片を lead citrate で染色し、透過型電子顕微鏡 (JEM T-8) で観察した。

## 結果

### 1. 先体糸切断精子の走査型電子顕微鏡による観察

先体糸切断前および後の精子を走査型電子顕微鏡により観察した。精巣より浸出したヒトデ未処理精子では、精子頭部後端に鞭毛よりなる尾部が観察された (図 3-1A)。精子頭部は、直径約 1.5  $\mu\text{m}$  の球形の核域と直径約 0.5  $\mu\text{m}$  の半球形のミトコンドリア域より構成され、頭部先端にはくぼみが見られる。このくぼみ直下には先体胞が存在する (Schroeder and Christen, 1982)。ウルト

ラディスパーサーで処理した後の未反応精子頭部では、尾部が切断され消失していた（図 3-1B）。ヒトデ精子は、先体反応にともないミトコンドリア域が精子頭部側面へ移動することが知られているが（Dan, 1954）、ディスパーサー処理後の精子頭部では、ミトコンドリア域の移動は観察されず、先端のくぼみも保持されていた。

卵海水処理を行い先体反応を誘起した精子では、先体系および尾部が観察された（図 3-1C）。この精子懸濁液にウルトラディスパーサー処理を行うと、先体系および尾部を消失した精子頭部が観察された（図 3-1D）。この時、精子頭部に残った先体系および尾部鞭毛の痕跡により、精子頭部の方向が区別できる。先体反応誘起直後の精子をウルトラディスパーサー処理した時にも、先体系および尾部の損失以外には体積の減少、ミトコンドリアの欠落など精子頭部自体に対する損傷は観察されなかった。

ウルトラディスパーサー処理により、先体反応誘起前および後の精子頭部をそれぞれ自体には損傷を与えることなく、完全な形で均質にかつ大量に単離できた。

## 2. 先体系切断精子による媒精

先体反応を誘起していないイトマキヒトデ精子を、ウルトラディスパーサー処理した後、イトマキヒトデ卵に加えた。未反応精子頭部を加えた場合、正常な精子を媒精したときに比べて受精膜形成の開始はやや遅れるが、約 3 分後におよそ 99 % の卵で受精膜が観察された。その後、正常な精子を用いた受精卵と同様の時間経過で卵割が進行した。一方、先体反応誘起直後の精子をウルトラディスパーサー処理して得た反応精子頭部を加えた場合、精子濃度、攪拌ともに尾部の切断された未反応精子頭部の場合と同一条件であるにもかかわらず、受精膜を形成し、卵割を進行した卵は少なくおよそ 13 % であった（表 3-1）。先体反応を誘起した精子をウルトラディスパーサー処理を行わずにインキュベートし、反応

精子頭部と同時間経た後に媒精すると 97 %の卵で受精が成立した。

精子は、先体系が機能しないと受精時にゼリー層および卵黄膜を通過できない可能性が考えられる（第2章、第3章）。そこで、上記と同様の実験をゼリー層および卵黄膜を除去したイトマキヒトデ裸卵に対して行った（表 3-2）。未反応精子懸濁液を裸卵に加えても、受精率はおおよそ 16 %であった。これは、ヒトデ卵原形質膜上の先体反応誘起活性が低いためである（Kyoizuka and Osanai, 1984）。裸卵をイトマキヒトデ卵海水中で媒精すると、47 %の卵で受精が成立し受精率の回復がみられた。一方、反応精子頭部の懸濁液を加えると、精子頭部は卵表と結合するが、受精の成立したものは約 13 %であった。卵海水処理後、ウルトラディスペルサー処理を行わず同時間経た対照精子は、87 %の卵で受精を成立させた。媒精を行わない対照卵も約 5 %の卵で核分裂が進行したが、これは卵黄膜除去時の pronase 処理にともなう単為付活によるものがある。

以上の結果より、先体系を切断された精子頭部はゼリー層、卵黄膜を除去したヒトデ裸卵に対しても、表層粒の崩壊などの卵の活性化を誘起できないものと考えられる。

### 3. 透過型電子顕微鏡による観察

先体反応を誘起した直後の精子をウルトラディスペルサー処理し、直ちにイトマキヒトデ裸卵に媒精し、透過型電子顕微鏡による観察を行った。精子は先体系基部のみでなく、頭部側面でも卵表と結合していた。ヒトデ裸卵の卵表は、精子頭部の周りに細胞質突起を形成し、精子頭部を捕えていた（図 3-2A）。精子頭部周囲には、正常受精時にみられる微細な細胞質顆粒より成る受精丘の形成はみられなかった。精子頭部は卵表の突出に包まれ、一部の頭部は卵内へ取り込まれた。この時精子の方向性は定まっておらず、尾部を進行方向にして取り込まれる場合も観察された（図 3-2B）。また原形質膜の融合は観察されず、ヒトデ卵に



取り込まれた精子頭部は、卵表下 10  $\mu\text{m}$  付近で二重の原形質膜（精子自身の原形質膜と卵原形質膜）に包まれた状態で留まっていた（図 3-2C）。この場合も、表層粒の崩壊、あるいは卵内に侵入した精子の膨潤などの変化は観察されなかった。

### 考察

先体を切除する本実験系の開発により、ヒトデ受精過程において、原形質膜融合、受精丘形成、卵の付活をともなわずに、精子頭部と卵表との直接反応を解析することができた。

#### 精子頭部は卵を付活しない

先体反応を誘起せずにウルトラディスパーサー処理して得た先体胞をもつ精子頭部は卵を高率に受精させるが、先体反応誘起直後にウルトラディスパーサー処理した先体の切断された精子頭部は卵を受精させなかった。先体反応誘起後の精子が受精能を保持しているのは 2 ～ 3 分であることから（Takahashi and Sugiyama, 1973; Vacquier, 1979）、ディスパーサー処理の過程で精子はすでに時間的に受精能を消失している可能性が考えられた。しかしあらかじめ先体反応を誘起した精子であっても、ウルトラディスパーサー処理を行わず、同時間インキュベートした場合には受精が成立した。従って、先体を切断した精子頭部が卵を受精させないのは、先体反応後の精子の受精能の消失によるものではなく、先体を切断されたことによるためであると考えられる。

ウニ卵の受精過程において、精子先体突起が卵表と結合してから、融合するまでの間に卵の活性化が起ると言われている（Hinkley *et al*, 1986; Longo *et*

al, 1986)。このことは精子先体突起に卵を付活する因子の存在する可能性を示唆する。環形動物ユムシでは、精子先体胞より卵を付活する物質が単離されている (Gould et al, 1986)。ウニ精子の場合には、先体突起が短いため先体突起と精子基部との区別が明確でない。一方、先体反応の明らかでないあるいは先体突起の機能の明瞭でないほ乳類、魚類あるいは両性類の場合、卵の活性化に先行して、精子先体基部もしくは精子頭部側面が卵表と接触する (Yanagimachi, 1988)。そこで、精子先体基部あるいは頭部にも卵を付活する因子の存在する可能性が考えられる。ヒトデ精子の正常受精過程では、精子先体系が卵表と結合または融合すると卵の活性化が始まり、受精膜の上昇、受精丘の形成が起こる (第2章)。しかし、先体系が切除された精子は、先体系基部もしくは頭部側面が卵原形質膜と接しても卵を付活できなかった。ヒトデ精子の場合、卵を付活する因子は精子頭部には存在せず、ウルトラディスペーサー処理で除かれた部域 (精子先体系と判断される) に存在するものと考えられる。

精子頭部は卵表の包み込み反応を他の受精反応とは独立に誘起する

ウニ受精過程において、付活に伴う最初の膜電位の変化が起こってから 10 秒以内に両性配偶子間の原形質膜融合は成立する (Hinkley et al, 1986; Longo et al, 1986)。卵微絨毛が伸長して精子を包み込む反応は、受精膜上昇の開始する 20 ~ 30 秒までの間に観察される (Schatten and Mazia, 1976; Epel, 1977; Schatten and Schatten, 1980)。ヒトデ受精時にも先体系先端が卵原形質膜と融合した後、受精丘の一部が突出して精子頭部を包み込む。一方ハムスター卵の場合には、精子頭部は先ず卵表の微絨毛に絡めとられた後、膜融合を起こす (Shalgi and Phillips, 1980; Yanagimachi, 1981)。これらのことより、卵表における精子頭部包み込み反応は、両性配偶子間の膜融合とは直接因果関係なしに独立に進行するものと考えられる。本実験で、先体系の切断された精子頭部を

媒精すると、卵原形質膜は精子頭部を包み込むにもかかわらず、卵は付活されず、受精丘も形成されなかった。このことより、精子頭部包み込み反応は卵の活性化あるいは受精丘形成とは独立に精子頭部に対して起こる卵表の反応であると判断される。

#### 精子頭部と卵表との原形質膜融合は起こらない

ほ乳類、魚類などの卵では、受精時に精子頭部側面で膜融合の起こることが報告されている（Gwatkin, 1976; Iwamatsu and Ohta, 1978; Yanagimachi, 1988）。また、polyethylene glycol を用いたヒトデ精子とウニ卵との交雑では、精子頭部が卵と融合する（第4章 第2節）。これらの報告は、精子頭部の原形質膜も卵原形質膜と融合できることを示唆している。ヒトデ正常受精時に、精子頭部が卵原形質膜と接したとき、精子頭部は卵表の突起に包まれる。この時すでに先体糸と卵原形質膜との膜融合は起こっているが、さらに精子頭部は卵細胞質突起との間で新たな原形質膜融合を起こすのであろうか。先体糸を切除した精子頭部を媒精した時に原形質膜融合が起こらないので、ヒトデ精子頭部側面原形質膜は、正常な受精過程においても卵原形質膜と融合しないものと思われる。

#### 卵表で誘起される精子頭部包み込み反応と他の細胞における取り込み反応との関連

ヒトデ裸卵表面による精子頭部の取り込みは、卵表の原形質膜が落込み原形質膜で精子頭部を包んだまま取り込む点で、食作用による物質の取り込みと極めて類似している。培養体細胞を用いた実験において、精子が細胞内へ食作用的に取り込まれる例が報告されている（Phillips *et al.*, 1976）。この反応は受精能（capacitation）を獲得した精子に限定され、精子は原形質膜融合を伴わずに細胞内に侵入し、細胞内で前核を形成することなしに退化する。一方、病的な例と

してヒト卵母細胞が酵母を捕食する例も報告されている（Koehler *et al*, 1978）。これらのことは、受精能を持った精子が卵表に食作用を誘起すること、また卵表には、食作用的に物質を取り込む機能のあることを示している。生理条件下で、精子が食作用的に卵に取り込まれる例は、マウスにおいて報告されている。マウス卵の場合、受精卵もしくは割球が過剰精子を取り込みこれを退化させる（Thompson and Zamboni, 1973; Yu and Wolf, 1981）。ウニ受精卵においても表層粒の崩壊によって増加した細胞膜の一部は、卵表の食飲作用によって減少すると考えられている（Carron and Longo, 1984）。本実験により、未受精卵卵表にも精子を食作用的に取り込む機能のあることが明らかになった。本研究第2章で観察されたヒトデ卵表の精子頭部包み込み反応は、卵表の持つ食作用的な機能の現れと解され、これは両性配偶子間の膜融合や卵の活性化とは独立に、卵表が精子頭部と接したときに誘起される。卵原形質膜の持つこの機能は、受精過程において精子を卵内に取り込む機構として働いているものと思われる。

## 要約

受精時におけるイトマキヒトデ精子頭部および先体糸の役割を検討するため、先体反応を誘起した直後の精子懸濁液をウルトラディスペーサーで処理し、精子から先体糸および尾部を切除して、精子頭部を単離した。ゼリー層および卵黄膜を除去したイトマキヒトデ裸卵にこの精子頭部を加えたところ、精子頭部は卵表に結合したが卵を付活しなかった。精子頭部は卵原形質膜と融合せず、二重の原形質膜に包まれたまま卵内へ取り込まれた。先体糸を欠く精子頭部は、卵表に精子頭部包み込み反応を誘起するが、頭部自体には卵表と膜融合し、また卵を付活する能力はないものと考えられる。

## 文献

- Carron C.P. and Longo F.J.(1984): Pinocytosis in fertilized sea urchin (Arbacia punctulata) eggs. J. Exp. Zool. 23: 413-422.
- Dan J. (1954): Studies on the acrosome. II. Acrosome reaction in starfish spermatozoa. Biol. Bull. 107: 203-218.
- Epel D. (1977): The problem of fertilization. Sci. Amer. 237: 128-138.
- Gould M., Stephano J.L., and Holland L.Z. (1986): Isolation of protein from Urechis sperm acrosomal granules that binds sperm to eggs and initiates development. Develop. Biol. 117: 306-318.
- Gwatkin R.B.L. (1976): Fertilization. In Poste G., Nicolson G.L. (eds): "The Cell Surface in Animal Embryogenesis and Development.", North-Holland Pub., Amsterdam, pp. 1-54.
- Hinkley R.E., Wright B.D., and Lynn J.W. (1986): Rapid visual detection of sperm-egg fusion using the DNA-specific fluorochrome Hoechst 33342. Develop. Biol. 118: 148-154.
- Iwamatsu T. and Ohta T. (1978): Electron microscopic observation on sperm penetration and pronuclear formation in the fish egg. J. Exp. Zool. 205: 157-180.
- Koehler J.E., Smith W.D., and Ravnik S. (1987): Phagocytosis of yeast by human oocytes: Fine structural observations. Gamete Res. 17: 237-244.
- Kyozuka K. and Osanai K. (1984): Denuded starfish oocytes can be fertilized with acrosome-reacted sperm. Bull. Mar. Biol. Stn. Asamushi, Tohoku Univ. 17: 216-216.
- Kyozuka K. and Osanai K. (1988): Sperm-engulfing response of sea

urchin egg surface inseminated with acrosome-reacted starfish sperm. Gamete Res. 21: 169-177.

Longo F.J., Lynn J.W., McCulloh D.H., and Chambers E.L. (1986): Correlative ultrastructural and electrophysiological studies of sperm egg interactions of sea urchin, Lytechinus variegatus. Develop. Biol. 118: 155-166.

Phillips S.G., Phillips D.M., Der V.G., Miller D.A., Van Diggelen O.P., and Miller O.J. (1976): Spontaneous cell hybridization of somatic cells present in sperm suspensions. Exp. Cell Res. 98: 429-443.

Schatten G. and Mazia D. (1976): The penetration of the spermatozoon through the sea urchin egg surface at fertilization. Observations from the outside on whole eggs and from the inside on isolated surfaces. Exp. Cell Res. 98: 325-337.

Schatten H. and Schatten G. (1980): Surface activity at the egg plasma membrane during sperm incorporation and its cytochalasin B sensitivity. Scanning electron microscopy and time-lapse video microscopy during fertilization of sea urchin Lytechinus variegatus. Develop. Biol. 78: 435-449.

Schroeder T.E. and Christen R. (1982): Polymerization of actin without acrosomal exocytosis in starfish sperm. Visualization with NBD-phalloidin. Exp. Cell Res. 140: 368-371.

Shalgi R. and Phillips D. (1980): Mechanics of sperm entry in cycling hamsters. J. Ultrastruct. Res. 71: 154-161.

Takahashi Y.M. and Sugiyama M. (1973): Relation between the acrosome reaction and fertilization in the sea urchin. 1. Fertilization in

- Ca-free sea water with egg water treated spermatozoa. *Develop. Growth and Differ.* 15: 261-268.
- Thompson R.S. and Zamboni L. (1973): Phagocytosis of supernumerary spermatozoa by two-cell mouse embryos. *Anat. Res.* 178: 3-14.
- Vacquier V.D. (1979): The fertilizing capacity of sea urchin sperm rapidly decreases after induction of the acrosome reaction. *Develop. Growth and Differ.* 21: 61-69.
- Yanagimachi R. (1981): Mechanism of fertilization in mammals. In Mastroianni L. and Biggers J.D. (eds): "Fertilization and Embryonic Development in Vitro.", Plenum, New York. pp. 81-182.
- Yanagimachi R. (1988): Sperm-egg fusion. *Curr. Top. Membr. Transp.* 32: 3-43.
- Yu S.F. and Wolf D.P. (1981): Polyspermic mouse eggs can dispose of supernumerary sperm. *Develop. Biol.* 82: 203-210.



## 第2節 ウニ卵によるヒトデ精子頭部包み込み反応

### － polyethylene glycol による交雑受精の誘起 －

#### 序論

ウニ卵にヒトデ精子を媒精した時、ゼリー層および卵黄膜を除去したウニ裸卵は、卵表の細胞質突起で先体反応誘起直後の精子の頭部を包み込む。しかし両性配偶子間の膜融合および卵の活性化は起こらず、精子は卵表面に留まる (Kyozyuka and Osanai, 1988)。この組合せにおいて交雑受精の起こらないのは、卵原形質膜の精子頭部包み込み反応が誘起されているにも関わらず、両性配偶子間の原形質膜融合が起こらないためであると考えられる。これが事実であれば、ウニ卵とヒトデ精子の交雑受精は、原形質膜融合を誘起してやることにより促進できるであろう。そこで細胞融合剤を用いて、ウニ卵とヒトデ精子の間に原形質膜融合を誘起する実験を試みた。その結果、ヒトデ精子頭部を包み込んだウニ卵を polyethylene glycol で処理することによって、原形質膜融合およびその後の発生を伴った異網間の交雑受精に成功した。

#### 材料と方法

材料・・・材料は、キタムラサキウニ (*Strongylocentrotus nudus*) 卵とイトマキヒトデ (*Asterina pectinifera*) 精子を用い、これらは浅虫臨海実験所周辺で採集した。雌ウニ体腔に 0.5 M KCl を注射して、放出させた卵は、濾過海水で洗った後、2 分間酸性海水 (pH 5.4) 処理を行い、ゼリー層を除去した。卵黄膜は室温 (15°C) で 10 分間 trypsin 海水処理 ( $2 \times 10^{-4}\%$ , Sigma Chemical Co.) を行って除去した。ウニおよびヒトデの精子は、雄の精巢を取り出し、浸

出してきた精子原液を媒精直前に希釈して使用した。イトマキヒトデ精子は運動性を高めるため、 $10\ \mu\text{M}$  histidine 海水で希釈した。

卵海水の調製・・・イトマキヒトデの卵巣を、濾過海水中で挟みで細かく裂き、絞り出された未成熟卵を、数回洗った後、酸性海水（pH 5.0）中で 10 分間穏やかに攪拌した。遠心法により卵を沈澱させた後、上澄み液を濾過し、 $0.1\text{N}$  NaOH で pH 8.2 に合わせ卵海水とした。

polyethylene glycol 処理・・・ $2.4 \times 10^9 / \text{ml}$  のイトマキヒトデ精子を、イトマキヒトデ卵海水で処理し、直ちにキタムラサキウニ裸卵に媒精した。卵の濃度は  $4.4 \times 10^9 / \text{ml}$  であり、媒精された溶液中の精子の最終濃度は  $4.4 \times 10^9 / \text{ml}$  であった。媒精 10 分後に卵を海水で洗い、過剰な精子を除去した後、遠心で沈澱させ、パックとした。この卵のパック 1 滴（約 0.05 ml）を、様々な分子量の 50% polyethylene glycol（PEG、Wako Pure Chemical Co.）海水 1 ml に懸濁した。卵の懸濁した polyethylene glycol 海水を 1 分間攪拌した後、9 ml の濾過海水を加え、2 分後に濾過海水で 2 回洗い、 $15\ ^\circ\text{C}$  のインキュベーター中に静置した。対照として、媒精後の裸卵を PEG 処理を行わずに濾過海水中でインキュベートした。ウニ正常受精卵が 4 細胞期になった時期に、各々およそ 300 個の卵で核分裂の有無を判定し受精率を算出した。交雑受精を高率に誘起するための条件を検討するために、キタムラサキウニ裸卵に、卵海水で処理したか、あるいは未処理のイトマキヒトデ精子を加え、分子量 3000 の PEG 海水で 1 分間処理した後、濾過海水中でインキュベートした。同様の実験は、酸性海水処理（pH 5.4）2 分でゼリー層を除去したキタムラサキウニ卵に対しても行った。

電子顕微鏡観察・・・PEG 処理 3 分後に、卵を glutaraldehyde と paraformaldehyde を含む Karnovsky の固定液で 40 分間前固定した。試料を濾過海水で洗った後、1% osmium tetroxide 海水で 1 時間後固定し、アセトンシリーズで脱水した。引き続いて epon に包埋し、超薄切片とした試料を、

uranyl acetate と lead citrate で二重染色し、透過型電子顕微鏡（JEM T-8）で観察した。

## 結果

### 1. polyethylene glycol 処理による異網間の交雑受精の誘起

ゼリー層、卵黄膜を除去したキタムラサキウニ裸卵に、卵海水処理をしたイトマキヒトデ精子を加えると、精子は卵原形質膜と結合した。精子の付着した卵を異なる分子量の PEG（分子量 2000, 3000, 7500, 20000）海水で処理した後、濾過海水に戻した（表 4-1）。

分子量 2000 の PEG で処理すると、およそ 56% の卵で、PEG 処理後 10 分までに透明層が形成され、そのうちの 25% の卵では 2 時間以内に多極型分裂が起こった。残りの 44% の卵は PEG 処理中もしくは直後に壊れた。分子量 3000 の PEG で処理すると、31% の卵で二極型分裂、21% で多極型分裂、さらに 28% で細胞質分裂を伴わずに核分裂のみが進行した。分子量 7500 あるいは 20000 の PEG で処理すると、90% の卵では付活が起らず、未受精卵のまま留まり、核分裂の進行する卵あるいは壊れる卵の割合はそれぞれ 6%、4% と低かった。以上の結果より、キタムラサキウニ卵とイトマキヒトデ精子の組合せにおいては、分子量 3000 の PEG 処理で 1 分間処理すると最も高率に核分裂が誘起されることが明らかになった。

### 2. 交雑受精を誘起するための先体反応誘起精子の必要性

PEG による交雑受精の誘起に、あらかじめ先体反応を起こした精子を媒精しておくことが必要であるかどうかの検討を行った（表 4-2）。

予め先体反応を起こした精子を媒精し、PEG 処理を行った場合、およそ 91% の卵で核分裂が進行した。未処理精子を媒精した後に、PEG 処理を行っても、付活され核分裂の進行する卵は 16% と少数であった。PEG 処理は、キタムラサキウニ裸卵の初期発生に影響を与えなかった。キタムラサキウニ精子で媒精した正常受精卵は、PEG 処理を行った後、ブルテウスまで発生した。媒精せずに分子量 3000 の PEG 処理のみを行った場合には、キタムラサキウニ卵の核分裂は起こらなかった。

上記と同様の方法により、ゼリー層を除去したキタムラサキウニ卵に、イトマキヒトデ精子を媒精し、PEG 処理を行った（表 4-2）。未処理精子を媒精した後に PEG 処理を行った時、4% の卵で核分裂が進行した。卵海水処理を行った精子を媒精すると、精子は脱ゼリー卵の卵表に結合するが、付活される卵は希であった。これらの卵のおよそ 28% は PEG で処理した後、核分裂を進行し、一部では細胞分裂も起こした。脱ゼリー卵において核分裂の進行する割合は、裸卵のそれに比べて低かった。

### 3. 侵入した精子の電子顕微鏡による観察

PEG 処理後卵内へ侵入している精子を、透過型電子顕微鏡で観察した。PEG 処理後 3 分で、イトマキヒトデ精子由来の精子核、ミトコンドリア、鞭毛は卵細胞質突起中に観察された（図 4-1A）。侵入した精子周囲の細胞質は、正常受精時の受精丘中に観察される微細な細胞質顆粒よりなっていた（図 4-1B,C）。これらの精子器官は、精子原形質膜により包まれていなかった。ほとんどの表層粒は、卵表層より消失していた。透過型電子顕微鏡による観察より、精子は原形質膜融合を伴って卵内へ侵入していることが明らかになった。

### 4. 交雑胚の初期発生

先体反応を誘起したヒトデ精子をウニ裸卵に媒精すると、多数の精子が卵表に結合するが卵は付活されない（図 4-2A）。精子の付着した卵に PEG 処理を行い、交雑受精の起こった胚の初期発生過程を観察した。PEG 処理（分子量 3000）を行った後、1/3 の卵は二極型の分裂を行い（図 4-2B）、その大半は遊泳胞胚になるが（図 4-2C）、発生はそこで停止し、原腸陥入は観察されなかった。2/3 の卵では、3 個以上の星状体と前核が発達する（図 4-2D）。それらは、同時に 3 個以上の割球に分裂したり（図 4-2E）、細胞質分裂を伴わずに核分裂のみを進行したが、いずれも数回核分裂したところで発生を停止した。（図 4-2F）。

#### 考察

交雑受精は、様々な組合せにおいて調べられている。ウニ同士の場合、卵の外圍構造を除去したり（Osanai, 1972, 1973）、先体反応を誘起した精子で媒精すると（Kyojuka and Osanai, 1979）、異種の精子も卵原形質膜と融合し、卵に侵入する。本実験では、通常の方法では受精の成立しないウニ卵とヒトデ精子の組合せにおいて、PEG 処理を行うことにより交雑受精に成功した。この時、精子は原形質膜融合をともなって卵内へ侵入する。PEG は細胞の融合を促進することが知られており（Davidson and Gerald, 1977; Lucy, 1978; Holt and Dott, 1980）、PEG 処理により異種配偶子間の原形質膜融合が起こり、引き続いて受精過程が進行したものと考えられる。

卵黄膜を保持したままのウニ卵は、PEG 処理後も、ヒトデ精子による交雑受精率は低い。異種精子は、先体反応を起こした後であっても、卵黄膜を通過することは困難である（Glabe *et al*, 1981）。卵黄膜は、ウニ卵とヒトデ精子の原形

質膜同士の密着を妨げている。細胞融合剤による原形質膜融合の誘起には、細胞膜同士が密着していることが必要である (Eddy and Shapiro, 1976; Bennett and Mazia, 1981a)。ヒトデ精子頭部を包み込んだウニ裸卵では、卵の細胞質突起の原形質膜は精子頭部原形質膜と密着している。

PEG 処理後、多数の精子が原形質膜融合を経て、卵内へ侵入している。ウニ卵の早い多精受精防御機構は、未受精卵で  $-60$  mV 程度であった膜電位が受精直後に  $0$  mV 付近まで脱分極することによると言われている。電位を人為的に  $-10$  mV 以下に押さえると卵は多精受精となる (Jaffe, 1976)。すなわち、ウニ精子は膜電位の低い状態で卵と融合し卵内へ侵入する。PEG は、培養細胞の融合時に、膜電位を低下させることが報告されている (Maggio *et al*, 1976)。ヒトデ未受精卵の静止膜電位は  $-60$  mV 付近であり、受精直後に  $0$  mV 付近まで脱分極する。また、過熟卵で多精受精が起こり易いのは、受精にともなう膜電位の上昇が十分ではないためであり、遅れてきた精子も受精膜の上昇する前であれば卵原形質膜との融合が起こる (Miyazaki and Hirai, 1979)。本実験においても、PEG は卵あるいは精子の膜電位を低く抑えることで多数の精子の卵内への侵入を起こしているのかもしれない。

PEG 処理の結果、表層粒の崩壊を伴った卵の活性化が起こり、核分裂が進行する。PEG 処理のみでは、未受精卵は核分裂を起こさないで、これは PEG による単為付活効果ではない。細胞融合剤により融合した未受精卵同士では、活性化は起こらない (Bennett and Mazia, 1981a; Bulet *et al*, 1985; Vassetzky *et al*, 1986)。原形質膜融合それ自体は卵の活性化の刺激とはならない。さらに、未受精卵と受精卵を融合した時、未受精卵側は受精反応を示さず、表層粒の崩壊も起こらない (Bennett and Mazia, 1981b)。ウニ、ヒトデおよびユムシ卵において、Cytochalasin B は精子の侵入を抑制するが、膜融合および卵の付活は抑制しない (Gould-Somero *et al*, 1977; Longo, 1978; Byad and Perry, 1980;

Schatten and Schatten, 1980; 本文、第3章)。精子による卵の付活刺激は、原形質膜融合に先行して起こる (Hinkley et al, 1986; Longo et al, 1986)。本実験の結果も、精子の卵表への結合、あるいは卵表の精子頭部包み込みは、卵の付活の引金とはならないことを示している。付活の引金は、精子の卵表への結合から、融合に至る過程でひかれるものと考えられる。

## 要約

キタムラサキウニ卵とイトマキヒトデ精子の交雑組合せにおいて、あらかじめ先体反応を起こさせたヒトデ精子を、ゼリー層、卵黄膜を除去したウニ裸卵に媒精した。ウニ卵は細胞質突起でヒトデ精子頭部を包み込むが、受精はしなかった。これらのヒトデ精子の結合しているウニ卵を polyethylene glycol 海水（分子量 3000）で処理したところ、精子は原形質膜融合を伴って卵内に侵入した。この時、卵の付活が起こり核分裂が進行した。一方、先体胞を持った未反応精子を媒精しても精子頭部包み込み反応は誘起されなかった。このような卵に polyethylene glycol 処理を行っても、精子の卵内への侵入は起こらなかった。以上の結果は、精子の受容には卵と精子の原形質膜の融合と、卵表による精子（頭部）の包み込み反応の独立した二つの過程が関係していることを示唆する。



## 文献

- Bennett J. and Mazia D. (1981a): Interspecific fusion of sea urchin eggs. Surface events and cytoplasmic mixing. *Exp. Cell Res.* 131: 197-207.
- Bennett J. and Mazia D. (1981a): Fusion of fertilized and unfertilized sea urchin eggs. Maintenance of cell surface integrity. *Exp. Cell Res.* 134: 494-498.
- Bulet P., Kishimoto T., and Shirai H. (1985): Oocyte competence to maturation-inducing hormone. I. Breakdown of germinal vesicles of small oocytes in starfish, Asterina pectinifera. *Develop. Growth and Differ.* 27: 243-250.
- Byrd W. and Perry G. (1980): Cytochalasin B blocks sperm incorporation but allows activation of the sea urchin egg. *Exp. Cell Res.* 126: 333-342.
- Davidson R.L. and Gerald P.S. (1977): Induction of mammalian somatic cell hybridization by polyethylene glycol. *Methods Cell Biol.* 15: 325-338.
- Eddy E.M. and Shapiro B.M. (1976): Changes in the topography of the sea urchin egg after fertilization. *J. Cell Biol.* 71: 35-48.
- Glabe C., Buchalter M., and Lennarz W.J. (1981): Studies on the interactions of sperm with the surface of the sea urchin egg. *Develop. Biol.* 84: 397-406.
- Gould-Somero M., Holland L., and Paul M. (1977): Cytochalasin B inhibits sperm penetration into eggs of Urechis caupo (Echiura). *Develop. Biol.* 58: 11-22.

- Hinkley R.E., Wright B.D., and Lynn J.W. (1986): Rapid visual detection of sperm-egg fusion using the DNA-specific fluorochrome Hoechst 33342. *Develop. Biol.* 118: 148-154.
- Holt W.V. and Dott H.M. (1980): Chemically induced fusion between ram spermatozoa and avian erythrocytes; An ultrastructural study. *J. Ultrastruct. Res.* 71: 311-320.
- Jaffe L.A. (1976): Fast block to polyspermy in sea urchin eggs is electrically mediated. *Nature* 261: 68-71.
- Kyozuka K. and Osanai K. (1979): Heterospermic fertilization of sea urchin eggs pretreated with pancreatin. *Bull. Mar. Biol. Stn. Asamushi, Tohoku Univ.* 16: 179-188.
- Kyozuka K. and Osanai K. (1988): Sperm-engulfing response of sea urchin egg surfaces inseminated with acrosome-reacted starfish sperm. *Gamete Res.* 21: 169-177.
- Longo F.J. (1978): Effects of cytochalasin B on sperm-egg interactions. *Develop. Biol.* 67: 249-265.
- Longo F.J., Lynn J.W., McCulloh D.H., and Chambers E.L. (1986): Correlative ultrastructural and electrophysiological studies of sperm egg interactions of sea urchin, Lytechinus variegatus. *Develop. Biol.* 118: 155-166.
- Lucy J.A. (1978): Mechanisms of chemically induced fusion. In Poste G., Nicolson G.L. (eds): "Membrane Fusion.", Elsevier/North-Holland Biomedical Press, Amsterdam, pp. 267-304.
- Maggio B., Ahkong Q.F., and Lucy J.A. (1976): Poly(ethylene glycol) surface potential and cell fusion. *Biochem. J.* 158: 674-650.

- Miyazaki S. and Hirai S. (1979): Fast polyspermy block and activation potential. Correlated changes during oocyte maturation of a starfish. *Develop. Biol.* 70: 327-340.
- Osanai K. (1972): Hybridization of sea urchins, Hemicentrotus pulcherrimus and Glyptocidaris crenularis. *Ann. Rep. Fac. Educ. Univ. Iwate* 32: 1-11.
- Osanai K. (1973): Promotion of cross fertilization in sea urchin eggs treated with proteases. *Bull. Mar. Biol. Stn. Asamushi, Tohoku Univ.* 14: 205-215.
- Schatten H. and Schatten G. (1980): Surface activity at the egg plasma membrane during sperm incorporation and its cytochalasin B sensitivity. *Develop. Biol.* 78: 435-449.
- Vassetzky S.G., Skoblina M.N., and Sekirina G.G. (1986): Induced fusion of echinoderm oocytes and eggs. In Schroeder T.E. (ed): "Methods in Cell Biology. Vol. 27. Echinoderm Gametes and Embryos.", Academic Press, New York pp. 60-378.

## 第5章 総合考察

### 1. はじめに

ヒトデ卵は原形質膜の外側を、ゼリー層と卵黄膜の二層の外圍構造で包まれており、受精する精子はこの外圍構造を抜けて卵内へ侵入する。従来の知見および本研究における観察結果より、ヒトデ精子侵入過程は以下のように要約できる。

1) 卵に接近した精子は、ゼリー層表面で先体反応を起こし、先体をゼリー層中へ侵入させる。2) 先体先端は卵黄膜を通過し、卵原形質膜と融合する。この時卵表面では細胞質突起（受精丘）の形成と表層変化が開始する。3) 受精丘は、先体周囲に集合した電子密度の高い微細な細胞質顆粒の集合であり、この中には卵表と卵中心を結ぶ方向に、多数のアクチンフィラメントが出現し、卵表を底面、卵内へ侵入した先体先端を頂点とした円錐形に発達する。4) 先体は受精丘中に侵入し、精子頭部は上昇しつつある受精膜をはさんで受精丘表面と接触する。5) 精子頭部周囲の卵細胞質（受精丘の一部）が受精膜の外側に突出して、精子頭部を包み込む。6) この突出の退縮（吸収）にともなって、精子頭部は受精丘中へ引き込まれる。7) 精子頭部は、受精丘最深部より卵細胞質へ移動する。

本研究の結果、精子の侵入には先体突起と卵原形質膜の融合とともに、卵表面の微絨毛状突起による精子頭部の包み込み反応（sperm-engulfing response）を必要とすることが明らかになった。正常な受精過程では、この反応が起こるためには、先体突起が卵原形質膜と融合し、先体突起を軸にして受精丘が発達した後、この受精丘表面が精子頭部と接触しなければならない。以下において、精子侵入過程で精子および卵表面にみられる諸現象が精子侵入とどの様に関わっているかについて考察する。

## 2. 精子先体反応の役割

卵表面に到達した精子は、先体反応を起こす。先体反応には3つの重要な機能がある。すなわち(1)先体胞物質の放出、(2)先体胞内膜の露出、および(3)先体突起の形成である。放出された先体胞物質は卵外圍構造に作用し、これを溶解するか、種特異的な結合に関与する。ウニ精子の場合、ゼリー層を溶解する jelly dispersing enzyme (Vasseur, 1951; Brookbank, 1958; Isaka *et al*, 1966) および卵黄膜溶解酵素活性が知られており (Harris *et al*, 1977; Levine *et al*, 1978)、それぞれゼリー層および卵黄膜に対して作用し、精子の卵外圍構造の通過を助けると考えられている。また、精子と卵の種特異的な結合を仲介する物質 bindin も存在する (Vacquier and Moy, 1977)。Bindin は先体反応誘起後、精子先端部の先体突起周囲に存在することが明らかになっている (Moy and Vacquier, 1979)。カキ精子の bindin は受精する精子が卵膜上より先体突起を卵膜中に侵入させる際のアンカー的な役割を果たしているものと推察されている (Brandriff *et al*, 1978; Kyoizuka and Osanai, 1985)。先体反応誘起直後のヒトデ精子先体系基部には、電子密度の高い先体胞物質が観察された。ヒトデ精子の場合、先体胞物質の単離は行われているが (Christen, 1985)、この物質の受精過程への関与は明らかにされていない。先体系基部に存在する先体胞物質は、精子頭部とゼリー層表面との結合に介在することにより、先体系のゼリー層通過に関与している可能性が考えられる。

卵の付活は、両性配偶子間の原形質膜融合に先行して起こるものと考えられている (Hinkley *et al*, 1986; Longo *et al*, 1986)。受精時にウニ卵では膜電位の急激な変化が起こるが (Jaffe, 1976)、ウニ精子より得られた bindin は、受精時と同様に卵の膜電位の変化を引き起こすことが知られている (Longo *et al*, 1986)。精製された bindin は膜融合を促進する (Glabe, 1985)。またコムシ精子より取られた先体胞物質は、コムシ卵の卵割を誘起する (Gould *et al*,

1986)。さらにムラサキイガイ精子先体胞物質中には、卵の減数分裂を進行させる物質の存在することが報告されている (Tamaki and Osanai, 1985)。これらのことより、受精時に先体反応に伴い精子から放出される物質に、卵の活性化に関与するものがあることが考えられる。ヒトデの場合、精子先体系先端と卵表との反応により卵の活性化が起こること、先体系切除精子を媒精したときには卵の活性化が起こらないことより、卵を活性化する因子は先体系もしくはその周囲に存在しているものと考えられる。

ヒトデ精子はゼリー層表面で先体反応を起こし、伸長した先体系はゼリー層、卵黄膜を貫通し、卵原形質膜表面に到達する。本研究においては、精子頭部および先体系の機能を詳細に検討するために、先体反応誘起直後のまだ受精能を保持しているヒトデ精子から先体系の切除を行った。ヒトデの受精過程においては、先ず精子先体系が卵原形質膜と融合するが、先体系を切除された精子頭部は原形質膜融合を伴わずに卵に取り込まれた。先体系を切除された精子頭部は卵と融合しないので、正常では先体系のみが卵原形質膜と膜融合できるものと推察される。精子先体系の原形質膜は、未反応精子先体胞の内膜が、先体胞の開裂により外側に露出したものである (cf. Dan, 1967)。先体反応時に特定の構造を持った先体突起を形成しないゴカイ、あるいはほ乳類精子の場合には、原形質膜融合に関与するのはそれぞれ不定形の精子先体突起および先体基部の部分であるが、この領域はともに先体胞の開裂により新たに露出した先体胞内膜に由来する (Colwin and Colwin, 1961; Sato and Osanai, 1983; Yanagimachi, 1988)。通常の受精過程において、両性配偶子間の膜融合は、精子頭部外膜部分 (精子頭部および尾部原形質膜) ではなく、先体胞内膜由来の原形質膜と卵原形質膜との間でのみ起こるものと考えられる。ヒトデの場合、先体反応による先体系の伸長は、卵外囲構造を通過して膜融合能を持った先体胞内膜を卵原形質膜と接触させることになる。

先体系先端と卵原形質膜の融合の後、先体系周囲の卵表層には、微細な細胞質顆粒の集合した精子侵入部位（受精丘）が形成される。この受精丘は先体系を中心にして、卵内部方向へ発達すると同時に、卵表面から突出する。マガキの場合、先体系が卵膜直下の卵原形質膜と融合した後、先体系周囲に卵細胞質が突出し、精子侵入路が形成される。一方、精子先体反応にともない軸芯を持った先体突起の形成されないゴカイ精子の場合、先体系は卵膜上に突出した卵微絨毛と接触、融合し、この微絨毛中のアクチンフィラメントを中心にして精子侵入路が形成される（Sato and Osanai, 1983）。このことは、受精丘（精子侵入部位）の形成には軸芯となるアクチンフィラメントが必要であり、ヒトデの場合には卵内へ侵入した先体系が軸芯となるものと考えられる。

### 3. 受精丘の発達機構と精子受容における役割

精子先体系の卵内への侵入時に先体系周囲には受精丘が形成され、この中には微細な細胞質顆粒が集合し、精子先体系と平行して多数のアクチンフィラメントが形成される。Cytochalasin B 海水中で媒精したとき、先体系を中心に微細な細胞質顆粒の集合は起こるが、先体系周囲にアクチンフィラメントは発達しない。受精丘は正常な円錐形状にならず、先体系の侵入も起こらない。ウニ、ユムシ、ホッキガイなどの受精過程は、ヒトデの場合と同様に cytochalasin B により抑制される（Gould-Somero *et al*, 1977; Longo, 1978a, 1978b, 1980; Byrd and Perry, 1980; Schatten and Schatten, 1980, 1981）。先体反応により精子は卵表面へ先体突起を伸長するにもかかわらず、精子侵入部位の卵表では正常な精子受容突起（受精丘あるいは精子侵入突起）が形成されず、精子頭部の卵表面との接触は起こらない。

ほ乳類の場合には cytochalasin B による精子侵入の抑制は起こらない（Longo, 1978b）。ほ乳類精子は先体反応にともない、アクチンフィラメント

からなる先体突起を形成しない。囲卵腔中に侵入した精子は自分自身の運動性により卵原形質膜上へ到達する（cf. Gwatkin, 1976; Yanagimachi, 1988）。この場合、精子頭部が卵原形質膜と接触する過程に、精子先体系および精子受容突起の発達は関与していないものと考えられる。ヒトデの場合、精子先体系は受精丘を発達させることにより、精子頭部が卵表面と直接接触できるようになるのであろう。マガキ卵より単離された卵膜に精子を加えると、精子は卵膜上で先体反応を起こし、先体系を卵膜中に侵入させるが精子頭部は卵膜を通過しない。これは、それに引き続く先体系周囲の卵細胞質突起の形成が起こらないためと考えられる（Kyojuka and Osanai, 1985）。ヒトデにみられる卵外囲構造の通過様式は、他の海産無脊椎動物、マガキ、イガイ、ゴカイ、ユムシなどにおける卵細胞質が突出して細胞質連絡（精子侵入路）を形成し、精子頭部と密着する過程とも機能面で一致するものと考えられる。

#### 4. 精子頭部の包み込み反応

精子先体系の受精丘中への侵入にともなって、精子頭部が受精丘表面と接触する。この時、卵原形質膜上では精子頭部包み込み反応が誘起される。受精過程は、いくつかの現象がほぼ同時に短時間のうちに進行するため、従来この包み込み反応を明確に捉えることは困難であった。本研究においては先体系の長いヒトデ精子を用いることで、精子頭部と卵表との反応を精子先体系と卵表との反応から区別して解析することができた。精子頭部包み込み反応は、ヒトデ正常受精過程において、精子頭部が卵原形質膜と接触した時点で誘起された。さらに先体系の切除された精子頭部をヒトデ裸卵に加えた場合にも誘起された。通常、この包み込み反応は先体系と卵の融合の後に起こるが、単離精子頭部を用いた実験より、先体系を欠いても起こることが明らかになった。またこの際、精子頭部と卵表との原形質膜融合の起こらないことより、この反応は膜融合とは独立した反応



である。この結果は、ウニ卵とヒトデ精子の異網間交雑においても支持される。ウニ裸卵表面は先体反応を起こしたヒトデ精子頭部を包み込むが、膜融合は起こらない (Kyo-zuka and Osanai, 1988)。

精子頭部包み込み反応、特に先体系を欠くヒトデ精子が原形質膜に包まれたまま卵細胞質中に取り込まれる過程は、マクロファージ等にみられる食作用 (phagocytosis) と形態的に極めて類似している。食作用は固形質が原形質膜に包まれたまま細胞内に取り込まれる現象である。受精時の精子頭部包み込み反応は、先体反応を起こした直後の精子頭部に対してのみ起こる現象である (Kyo-zuka and Osanai, 1988)。通常の食作用においては取り込み時の選択性は明確でない。マウスマクロファージの場合、取り込みには濃度依存性のあることが報告されている (馬屋原, 1978)。受精過程において、先体反応を起こしていない精子は卵黄膜を通過できずに、卵原形質膜上に到達することはできない (Glabe *et al*, 1981)。さらに卵黄膜と結合しても、直ちに離れてしまう (Aketa *et al*, 1979)。先体反応を起こした精子の場合先体胞物質が放出され、この中に含まれる bindin を介して精子は卵表と種特異的に結合する (Moy and Vacquier, 1979)。このことが受精過程において、先体反応を起こした精子のみが卵表と密着して留まるという食作用の誘起されるための条件を満たすものと考えられる。

また、マウスマクロファージにおいては、ムコ多糖類が取り込み反応を活性化 (Cohn and Parks, 1967)。ヒトデ精子も、先体胞中に糖が存在する (Christen, 1985)。先体反応にともない放出される先体胞物質は頭部側面に回り込むが (Dan and Hagiwara, 1967)、精子頭部受容反応は、精子頭部が卵表と接した時点でこの部域に対して誘起される (Kyo-zuka and Osanai, 1988)。先体胞物質は先体反応誘起後数分で精子頭部周辺から消失するが (Takahashi and Sugiyama, 1973; Sugiyama and Kato, 1977)、このことは取り込み反応

の活性維持時間と一致する (Kyozyuka and Osanai, 1988)。先体反応にともない放出される先体胞物質は精子頭部包み込み反応の誘起にも関与している可能性が示唆される。

Loeb (1917) は受精を食作用的な反応という観点で捉えていた。この考えは Tyler (1959, 1960) に受け継がれてきたが、それは明確な実験的証拠の上にたったものではなく、小さな物質が大きな細胞に侵入する様式として最も考え易いということであった。その後 Colwin ら (1961, 1963a, b) により、大きさの極端に異なる 2 つの細胞、卵と精子の間でも両細胞が接した時点で原形質膜融合が起ることが示された。平本 (1962) は原形質膜で包まれた未反応精子を直接卵内へ注入しても、受精反応の起こらないことを明らかにし、受精における食作用的な精子侵入様式は否定された。一方では卵および割球の表面は、フェリチン粒子あるいは過剰精子を取り込むことが報告されていたが (Carron and Longo, 1984; Koehler *et al.*, 1987)、受精時の卵表の機能に言及するものではなかった。本研究において提唱した受精時の卵表の精子頭部包み込み反応は、初めて実験的に精子侵入過程には食作用的な一面のあることを実証したものである。このような観点で精子侵入過程を見た時、ほ乳類、両性類、あるいは魚類においても受精する精子に対する卵表層の積極的な動きが観察されており (Schatten and Mazia, 1976; Picheral, 1977; Elinson and Manes, 1978; Shalgi and Phillips, 1980; Iwamatsu and Ohta, 1978)、精子侵入過程においてこの精子頭部包み込み反応は、種を越えて受精過程で共通して起こる重要な反応であると判断される。

卵および精子は互いを認識し接合子を作るために特殊化した細胞である。卵は受精後の発生を開始するために必要な物質をプールするために大型化し、この大型細胞を保護し、同種間でのみの単精受精を保証するために複雑な外囲構造が付加されている。精子もこの様な外囲構造を通過し精核を卵内へ導入するために、

先体反応などの特殊な機能を持っている。しかし、この様な付加機能を除いて、精子頭部が卵内へ入る過程のみを取り出した場合、細胞一般に起こる食作用的な一面が見えてくることは非常に興味深い。細胞本来の持つ食作用的な機能の上に、卵外圍構造の違い、精子先体糸の長さ、あるいは両性配偶子間の原形質膜融合のタイミングなどにより多様性に富んだ受精様式が形作られているものと思われる。

## 5. 結論

図 5-1 にヒトデ受精過程で起こる一連の反応の相互の関連性をまとめた。この模式図に示した諸反応が進行するときの、精子および卵の構造の機能について、本研究の結果明らかになった主要な点は以下の通りである。

1) 先体突起は受精の成立に不可欠な構造である。その一つの機能は融合能を持った先体胞内膜を卵原形質膜と接触できるようにし、融合を可能にすることであり、他は融合後受精丘の発達のための卵細胞質の移動の軸となることである。この受精丘の発達には卵表層のアクチンフィラメントが関与している。

2) 融合後受精丘は先体突起に沿って発達し、卵表面は精子頭部と接触可能となる。卵表面は精子頭部と接触した後微絨毛状突起によって精子頭部を包み、これを取り込む。精子頭部の取り込みを誘起するため卵表面と精子頭部との接触をもたらす過程として、受精丘は重要な役割を持つ。

3) 精子頭部包み込み反応は、精子頭部を卵内に取り込むために必要な反応であり、食作用と共通点のある現象である。卵の精子受容には、原形質膜融合の他に精子頭部に対する卵表面の包み込みが必要である。

## 文献

- Aketa K., Yoshida M., Miyazaki S., and Ohta T. (1979): Sperm binding to an egg model composed of agarose beads. *Exp. Cell Res.* 123: 281-284.
- Brandriff B., Moy G.W., and Vacquier V.D. (1978): Isolation of sperm bindin from the oyster (Crassostrea gigas). *Gamete Res.* 1: 89-99.
- Brookbank J.W. (1958): Dispersal of the gelatinous coat material of Mellita quinquiesperforata eggs by homologous sperm and sperm extracts. *Biol. Bull.* 115: 74-80.
- Byrd W. and Perry G. (1980): Cytochalasin B blocks sperm incorporation but allows activation of the sea urchin egg. *Exp. Cell Res.* 126: 333-342.
- Carron C.P. and Longo F.J.(1984): Pinocytosis in fertilized sea urchin (Arbacia punctulata) eggs. *J. Exp. Zool.* 23: 413-422.
- Christen R. (1985): Isolation of acrosomal vesicles and their surrounding membranes from starfish sperm. *Develop. Growth and Differ.* 27: 529-538.
- Cohn Z.A. and Parks E. (1967): The regulation of pinocytosis in mouse macrophages. II. Factors inducing vesicle formation. *J. Exp. Med.* 125: 213-237.
- Colwin A.L. and Colwin L.H. (1961): Changes in the spermatozoon during fertilization in Hydroides hexagonus (Annelida). II. Incorporation with the egg. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* 10: 255-274.

- Colwin A.L. and Colwin L.H. (1963a): Role of the gamete membranes in fertilization in Saccolossus kowalevskii (Enteropneusta). I. The acrosomal region and its changes in early stages of fertilization. J. Cell Biol. 19: 477-500.
- Colwin L.H. and Colwin A.L. (1963b): Role of the gamete membranes in fertilization in Saccolossus kowalevskii (Enteropneusta). II. Zygote formation by gamete membrane fusion. J. Cell Biol. 19: 501-518.
- Dan J. (1967): Acrosome reaction and lysins. In Metz C.B. and Monroy A. (eds.): "Fertilization.", Academic press, New York, pp. 237-293.
- Dan J.C. and Hagiwara Y. (1967): Studies on the acrosome. IX. Course of acrosome reaction in starfish. J. Ultrastruct. Res. 18: 562-579.
- Elinson R.P. and Manes M.E. (1978): Morphology of the site of sperm entry on the frog egg. Develop. Biol. 63: 67-75.
- Glabe C.G., Buchalter M., and Lennarz W.J. (1981): Studies on the interactions of sperm with the surface of the sea urchin egg. Develop. Biol. 84: 397-406.
- Glabe C.G. (1985): Interaction of the sperm adhesive protein, bindin, with phospholipid vesicles. II. Bindin induces the fusion of mixed-phase vesicle that contain phosphatidylcholine and phosphatidylserine in vitro. J. Cell Biol. 100: 800-806.
- Gould-Somero M., Holland L., and Paul M. (1977): Cytochalasin B inhibits sperm penetration into eggs of Urechis caupo (Echiura). Develop. Biol. 52: 11-22.
- Gould M., Stephano J.L., and Holland L.Z. (1986): Isolation of protein

- from Urechis sperm acrosomal granules that binds sperm to eggs and initiates development. *Develop. Biol.* 117: 306-318.
- Gwatkin R.B.L. (1976): Fertilization. In Poste G. and Nicolson G.L. (eds): "The Cell Surface in Animal Embryogenesis and Development.", North-Holland Pub., Amsterdam, pp. 1-54.
- Harris E.K., Fox S.J., Csernansky J.G., Zimmerman M., and Troll W. (1977): A chymotrypsin-like enzyme present in Arbacia punctulata spermatozoa. *Biol. Bull.* 153: 428-429.
- Hinkley R.E., Wright B.D., and Lynn J.W. (1986): Rapid visual detection of sperm-egg fusion using the DNA-specific fluorochrome Hoechst 33342. *Develop. Biol.* 118: 148-154.
- Hiramoto Y. (1962): Microinjection of the living spermatozoa into sea urchin eggs. *Exp. Cell Res.* 27: 416-426.
- Isaka S., Kanatani H., and Suzuki N. (1966): Jelly dispersing enzyme obtained from spermatozoa of sea urchin, Anthocidaris crassispina. *Exp. Cell Res.* 44: 66-72.
- Iwamatsu T. and Ohta T. (1978): Electron microscopic observation on sperm penetration and pronuclear formation in the fish egg. *J. Exp. Zool.* 205: 157-180.
- Jaffe L.A. (1976): Fast block to polyspermy in sea urchin eggs is electrically mediated. *Nature* 261: 68-71.
- Koehler J.E., Smith W.D., and Ravnik S. (1987): Phagocytosis of yeast by human oocytes: Fine structural observations. *Gamete Res.* 17: 237-244.
- Kyozuka K. and Osanai K. (1985): Sperm entry in oyster (Crassostrea

gigas) oocytes. Bull. Mar. Biol. Stn. Asamushi, Tohoku Univ. 18: 25-34.

Kyozuka K. and Osanai K. (1988): Sperm-engulfing response of sea urchin egg surface inseminated with acrosome-reacted starfish sperm. Gamete Res. 21: 169-178.

Levine A.E., Walsh K.A., and Fodor E.J.B. (1978): Evidence of an acrosin-like enzyme in sea urchin sperm. Develop. Biol. 63: 299-306.

Loeb J. (1917): Fécondation et Phagocytose. An. l'Inst. Pasteur 31: 437-441.

Longo F.J. (1978a): Surface alterations of fertilized sulf calm (Spisula solidissima) eggs induced by concanavalin A. Develop. Biol. 68: 422-439.

Longo F.J. (1978b): Effects of cytochalasin B on sperm-egg interactions. Develop. Biol. 67: 249-265.

Longo F.J. (1980): Organization of microfilaments in sea urchin (Arbacia puncturata) eggs at fertilization: Effect of cytochalasin B. Develop. Biol. 74: 422-433.

Longo F.J., Lynn J.W., McCulloh D.H., and Chambers E.L. (1986): Correlative ultrastructural and electrophysiological studies of sperm egg interactions of sea urchin, Lytechinus variegatus. Develop. Biol. 118: 155-166.

馬屋原宏 (1978): 細胞の取り込み "細胞生物学5 細胞表層の機能" 理工学社 pp. 249-283.

Moy G.W. and Vacquier V.D. (1979): Immunoperoxidase localization of

- bindin during the adhesion of sperm to sea urchin eggs. Curr. Top. Develop. Biol. 13: 31-44.
- Picheral B. (1977): La Fecondation chez le triton Pleurodele II. La penetration des spermatozoides et la reaction locale de l'oeuf. J. Ultrastruct. Res. 60: 181-202.
- Sato M. and Osanai K. (1983): Sperm reception by an egg microvillus in the polychaeta, Tylorrhynchus heterochaetus. J. Exp. Zool. 227: 459-469.
- Schatten G. and Mazia D. (1976): The penetration of the spermatozoon through the sea urchin egg surface at fertilization. Observations from the outside on whole eggs and from the inside on isolated surfaces. Exp. Cell Res. 98: 325-337.
- Schatten H. and Schatten G. (1980): Surface activity at the egg plasma membrane during sperm incorporation and its cytochalasin B sensitivity. Develop. Biol. 78: 435-449.
- Schatten G. and Schatten H. (1981): Effects of motility inhibitors during sea urchin fertilization. Microfilament inhibitors prevent sperm incorporation and restructuring of fertilized egg cortex, whereas microtubule inhibitors prevent pronuclear migrations. Exp. Cell Res. 135: 311-330.
- Shalgi R. and Phillips D. (1980): Mechanics of sperm entry in cycling hamsters. J. Ultrastruct. Res. 71: 154-161.
- Sugiyama M. and Kato K. (1977): Effect of trypsin on the fertilizing capacity of sea urchin spermatozoa treated with egg-water. Develop. Growth and Differ. 19: 23-29.



- Takahashi Y.M. and Sugiyama M. (1973): Relation between the acrosome reaction and fertilization in the sea urchin. 1. Fertilization in Ca-free sea water with egg water treated spermatozoa. *Develop. Growth and Differ.* 15: 261-268.
- Tamaki H. and Osanai K. (1985): Re-initiation of meiosis in Mytilus oocytes with acrosome reaction product of sperm. *Bull. Mar. Biol. Stn. Asamushi, Tohoku Univ.* 18: 11-23.
- Tyler A. (1959): Some immunobiological experiments on fertilization and early development in sea urchins. *Exp. Cell Res. Suppl.* 7: 183-199.
- Tyler A. (1960): Introductory remarks on theories of fertilization. In Ranzi S. (ed): "Symposium on Germ Cells and Earliest Stages of Development.", Fondazione A. Baselli, Milan, Milano. pp. 155-174.
- Vacquier V.D. and Moy G.W. (1977): Isolation of bindin: The protein responsible for adhesion of sperm to sea urchin eggs. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 74: 2456-2460.
- Vasseur E. (1951): Demonstration of a jelly-splitting enzyme at the surface of the sea-urchin spermatozoa. *Exp. Cell Res.* 2: 144-146.
- Yanagimachi R. (1988): Sperm-egg fusion. *Curr. Top. Membr. Transp.* 32: 3-43.

## 謝辞

本研究を行うにあたり終始ご指導下さった東北大学理学部、長内健治教授ならびに数々の御教示をいただいた東北大学理学部生物学教室、小西和彦教授、竹内拓司教授に心より感謝の意を表します。また、材料採集に御協力下さり、かつ数々の有益なご助言をいただいた東北大学理学部附属臨海実験所の皆様に御礼申し上げます。

## 図及び表

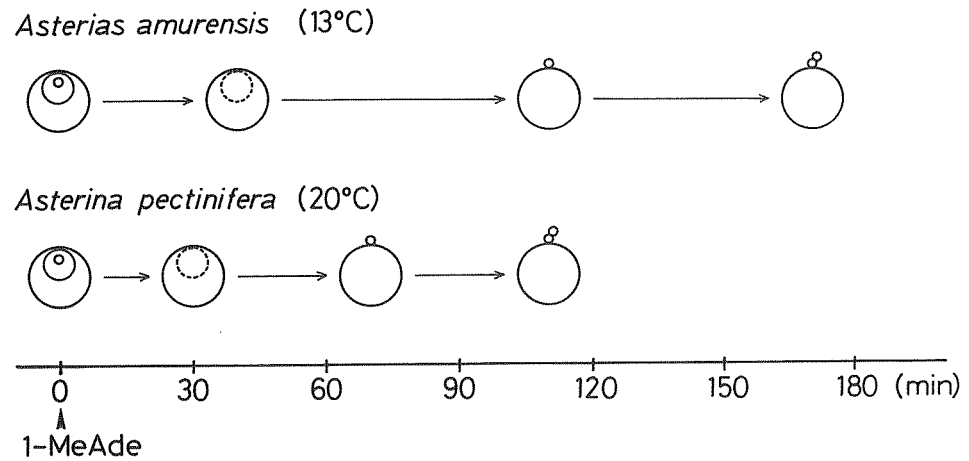


図 1-1 ヒトデおよびイトマキヒトデ卵成熟過程の時間経過

横軸： 1-メチルアデニン添加後の時間（分）

ヒトデ（*Asterias amurensis*）およびイトマキヒトデ（*Asterina pectinifera*）未成熟卵を採卵後、それぞれ 13 °C および 20 °C の海水中にいて、 $1 \mu\text{M}$  1-メチルアデニン（1-MeAde）を添加した時を 0 分として、卵核胞の崩壊、第一極体放出、第二極体放出の時間経過を観察した。

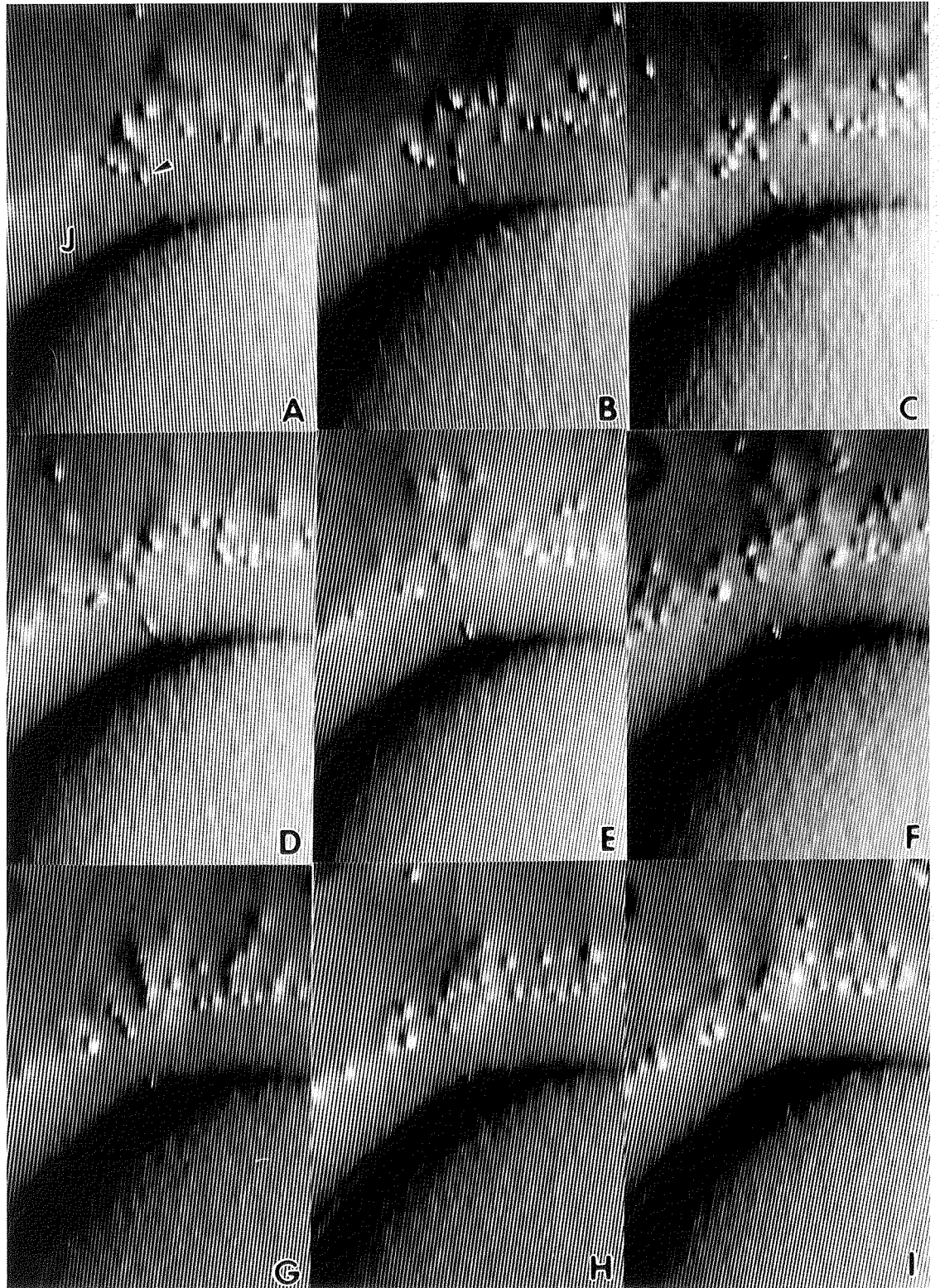


図 1-2 イトマキヒトデ過熟卵への精子侵入過程の連続観察

イトマキヒトデ過熟卵に媒精し、精子がゼリー層表面に到達した時点をも 0 秒として精子侵入過程をビデオ撮影装置を用いて連続観察した。A) 0 秒 B) 30 秒 C) 50 秒 D) 60 秒 E) 80 秒 F) 90 秒 G) 100 秒 H) 110 秒 I) 120 秒  
J: ゼリー層 矢印は侵入する精子 (x 900)

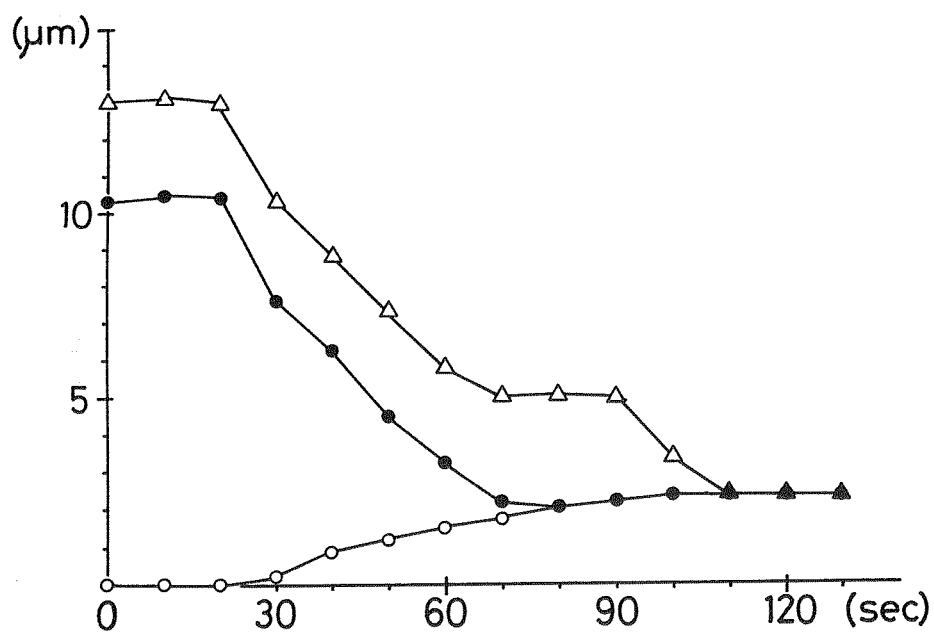


図 1-3 イトマキヒトデ過熟卵への精子侵入過程の時間経過

横軸： 媒精後の時間（秒） 縦軸： 卵表からの距離（μm）

○： 卵表から受精丘表面までの高さ、 ●： 卵表から精子頭部先端（先体糸基部）までの距離、 △： 卵表から精子頭部後端（尾部基部）までの距離

表 1 - 1 精子侵入過程の時間経過

	平均 (秒)
精子 (先体系) の侵入開始 <sup>1)</sup>	$20.7 \pm 3.4^{2)}$
精子頭部先端の卵受精丘表面との接触	$75.2 \pm 5.4$
精子頭部の卵受精丘への侵入開始 <sup>3)</sup>	$97.5 \pm 9.6$
精子頭部の侵入終了	$123.2 \pm 6.7$

- 1) 媒精後、受精する精子頭部が卵ゼリー層表面へ到達した時点を 0 秒とした  
この時点における精子頭部先端と卵黄膜との距離  
 $9.0 \pm 0.5 \mu\text{m}$  (n=11)
- 2) 標準誤差 n=11
- 3) この時点における受精丘の高さ  
 $2.4 \pm 0.1 \mu\text{m}$  (n=11)

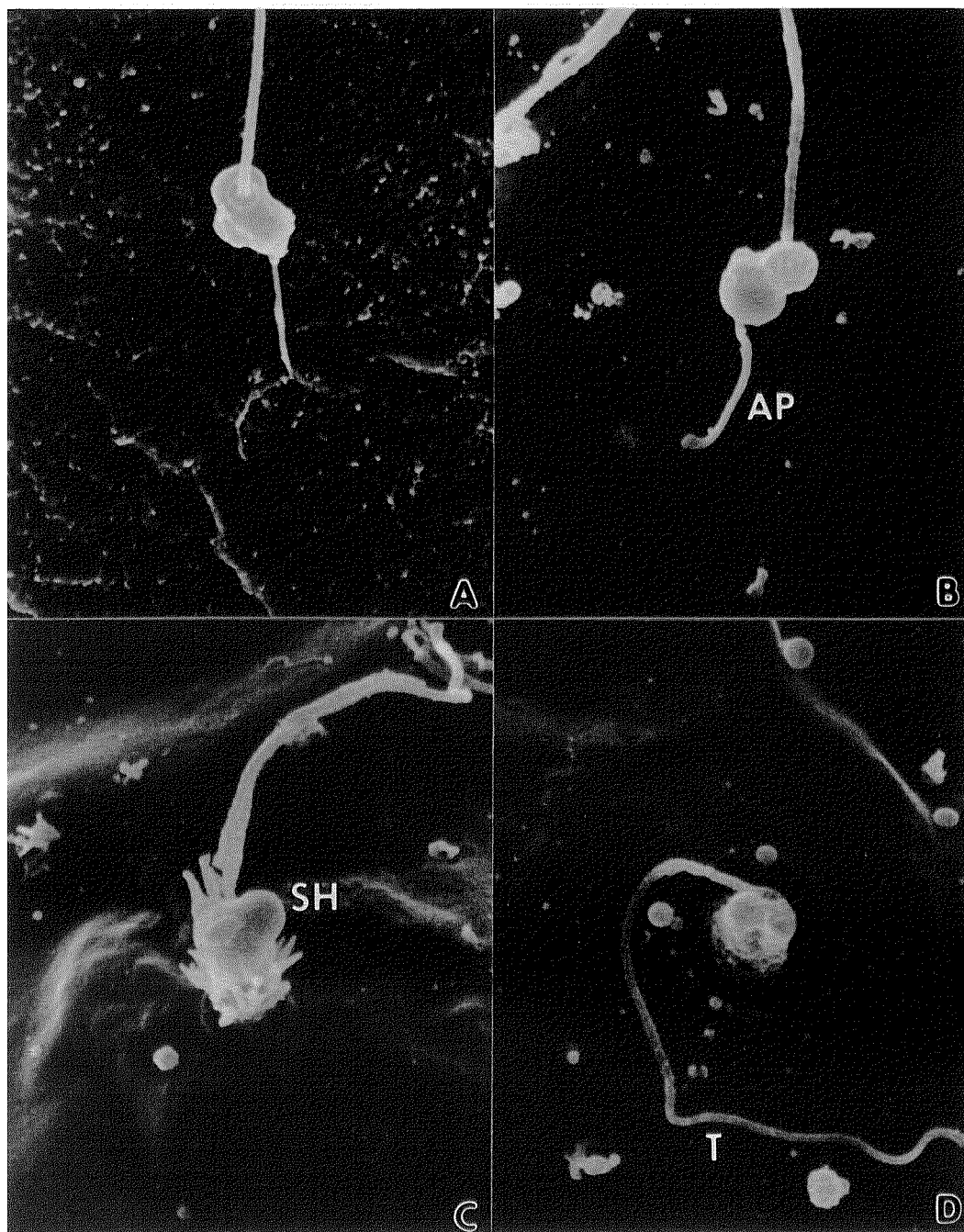


図 1-4 ヒトデ過熟卵への精子侵入過程の走査型電子顕微鏡による観察  
(x 7,000)

- A : 媒精 30 秒後、精子は先体反応を起こし先体系で卵表と結合していた。先体系先端部域の卵表では受精膜の上昇が開始した。
- B : 媒精 60 秒後、精子先体系 (AP) は上昇した受精膜中に侵入していた。
- C : 媒精 90 秒後、精子頭部 (SH) は、受精膜の外側で卵表からの突出により包み込まれた。
- D : 媒精 120 秒後、精子頭部は卵表からの突出の回復に伴い卵内へ侵入した。侵入していない精子尾部 (T) が、受精膜上に観察された。



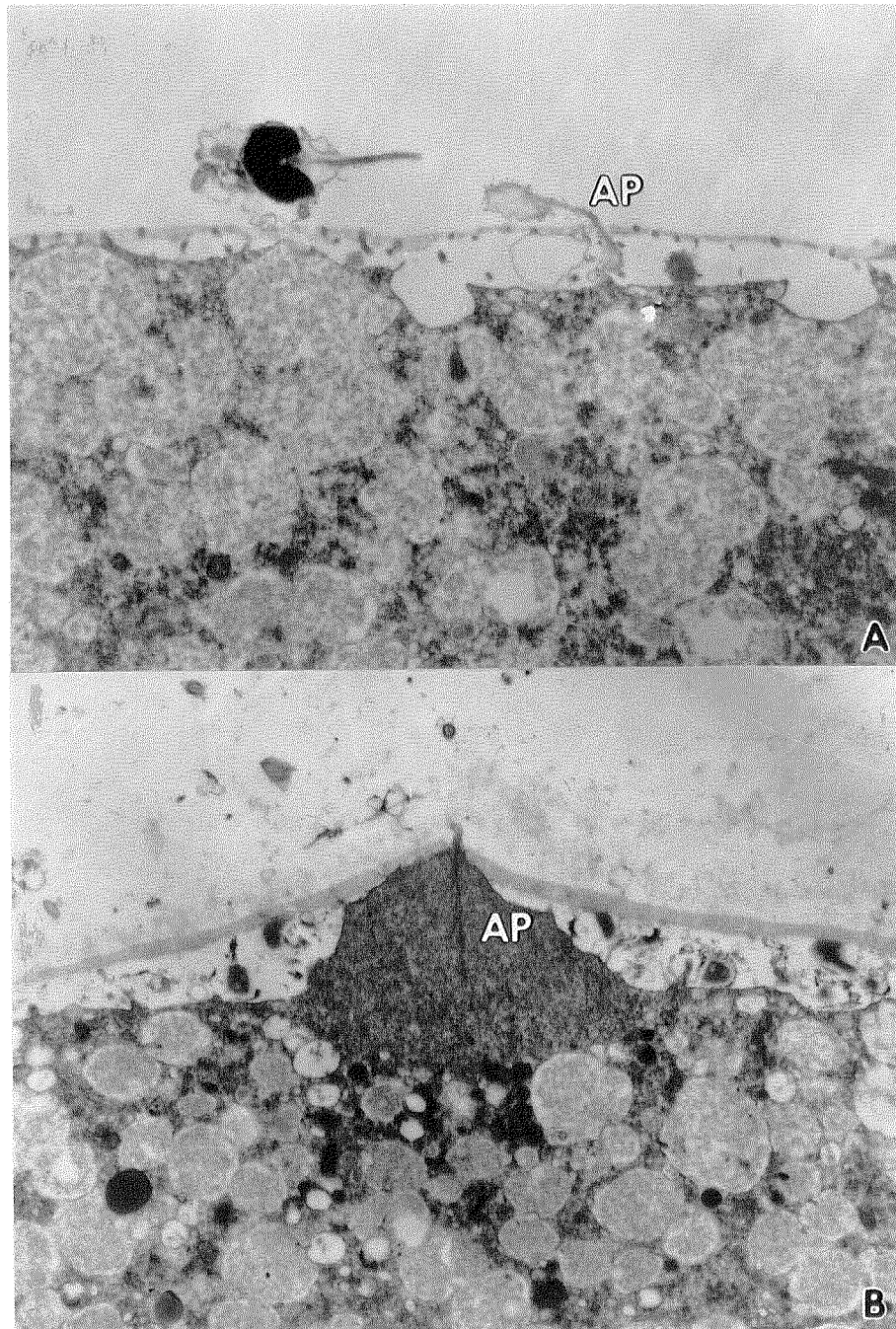


図 1-5 ヒトデ過熟卵への精子侵入過程の透過型電子顕微鏡による観察（その1）  
（x 6,780）

- A：媒精 30 秒後、精子は先体反応を起こし、先体系（AP）を卵黄膜中へ侵入させていた。先体系周囲では受精膜の上昇が開始した。
- B：媒精 30 秒後、精子先体系（AP）周囲に細胞質が突出し、受精丘の形成が開始した。

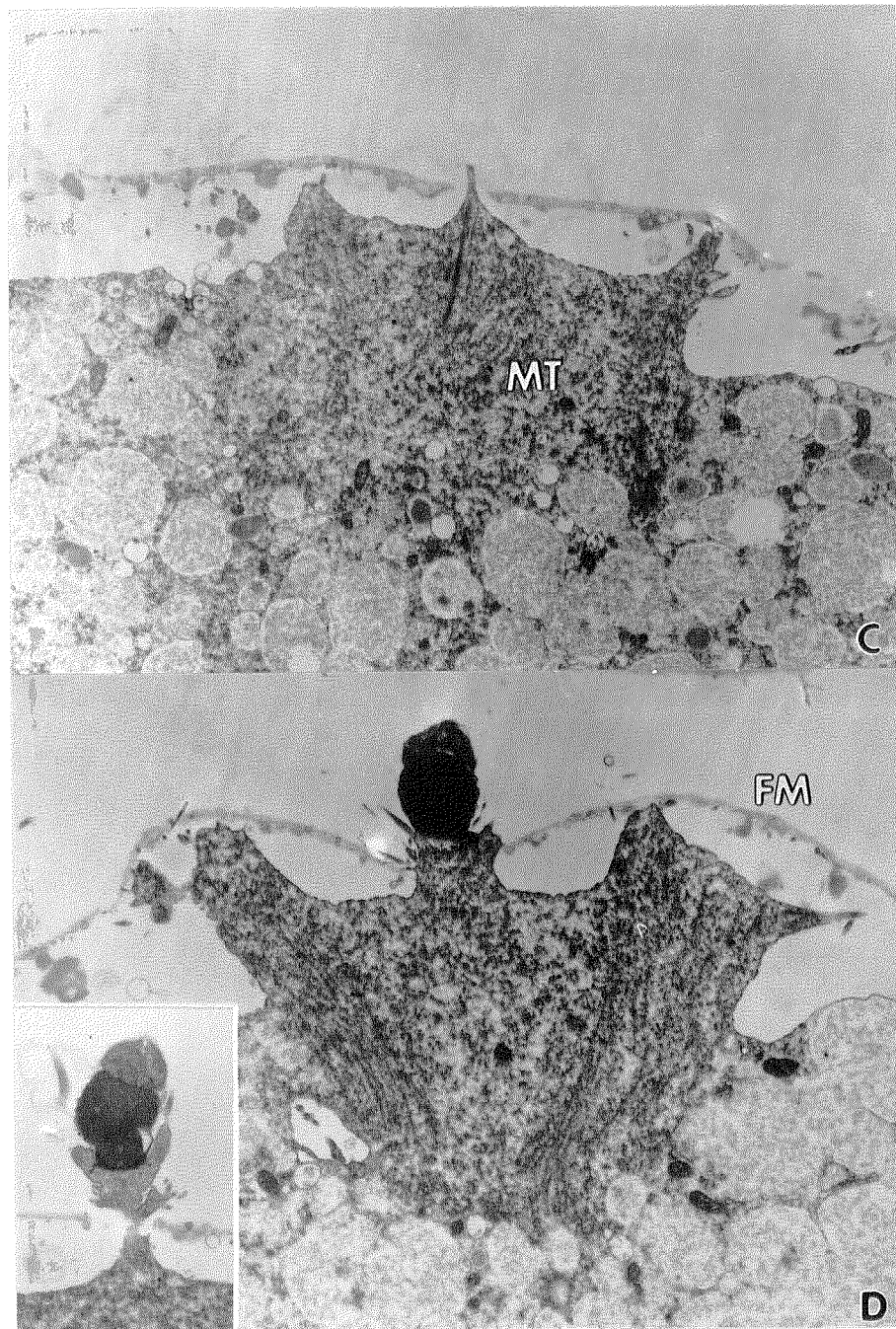


図 1-5 ヒトデ過熟卵への精子侵入過程の透過型電子顕微鏡による観察（その2）  
（x 6,780）

C：媒精 60 秒後、受精丘は卵表を底面とした円錐形状に発達した。卵表と垂直方向に繊維構造（マイクロフィラメント）（MT）が出現した。

D：媒精 90 秒後、精子頭部は受精膜（FM）をはさんで受精丘表面と接した。

（inset）受精丘を形成する卵細胞質の一部は、受精膜の外側まで突出して精子頭部を包み込んだ。

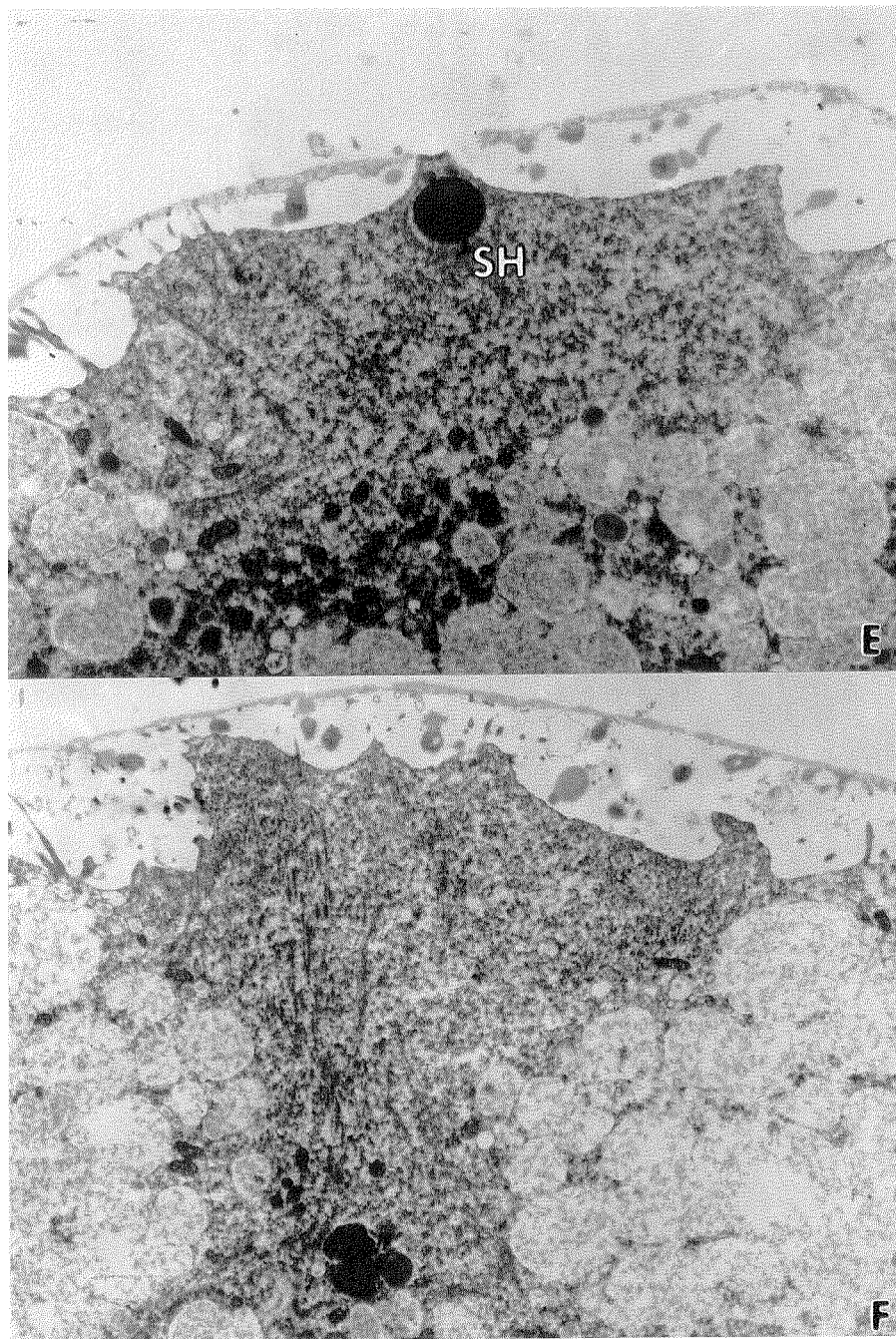


図 1-5 ヒトデ過熟卵への精子侵入過程の透過型電子顕微鏡による観察（その3）  
（x 6,780）

E：媒精 120 秒後、精子頭部（SH）は細胞質突起の回復にともなって、受精丘中へ侵入した。

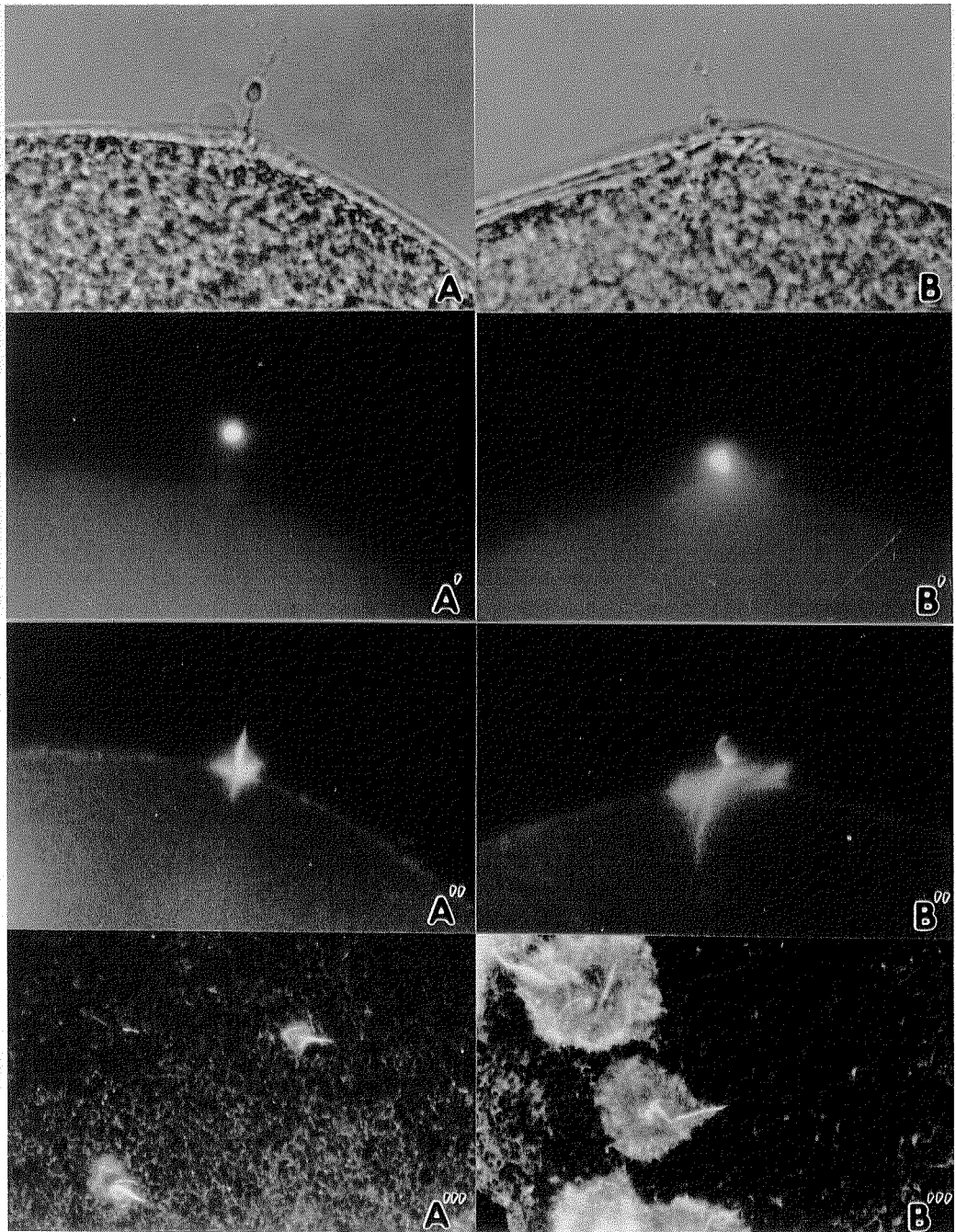
F：媒精 180 秒後、受精丘中へ侵入した精子は直ちに受精丘最深部へ侵入した。

図 2-1 イトマキヒトデ過熟卵への精子侵入過程の蛍光染色 (1) (x 1,170)  
イトマキヒトデ過熟卵に媒精後、一定時間で固定した。試料はアクチンフィラメントを観察するために NBD-phalloidin、核を観察するために DAPI、さらに形成されつつある受精丘を卵内部方向から観察するため単離表層に NBD-phalloidinで蛍光染色を行った。

A：媒精 1 分後、精子は先体系で卵表と接触していた。A'：同一試料の DAPI 像。A''：同一試料の NBD-phalloidin 像。精子先体系、および先体系直下の卵表が強く染色された。A'''：同一試料より得られた単離表層の NBD-phalloidin 像。先体系および形成されつつある受精丘が観察された。

B：媒精 1.5 分後、精子頭部は受精丘表面に到達していた。B'：同一試料の DAPI 像。B''：同一試料の NBD-phalloidin 像。精子先体系は受精丘中へ侵入しており、その周囲の卵表も染色され、透過型電子顕微鏡により観察されたマイクロフィラメントの分布に対応している。B'''：同一試料より得られた単離表層の NBD-phalloidin 像。侵入した先体系周囲が染色された。





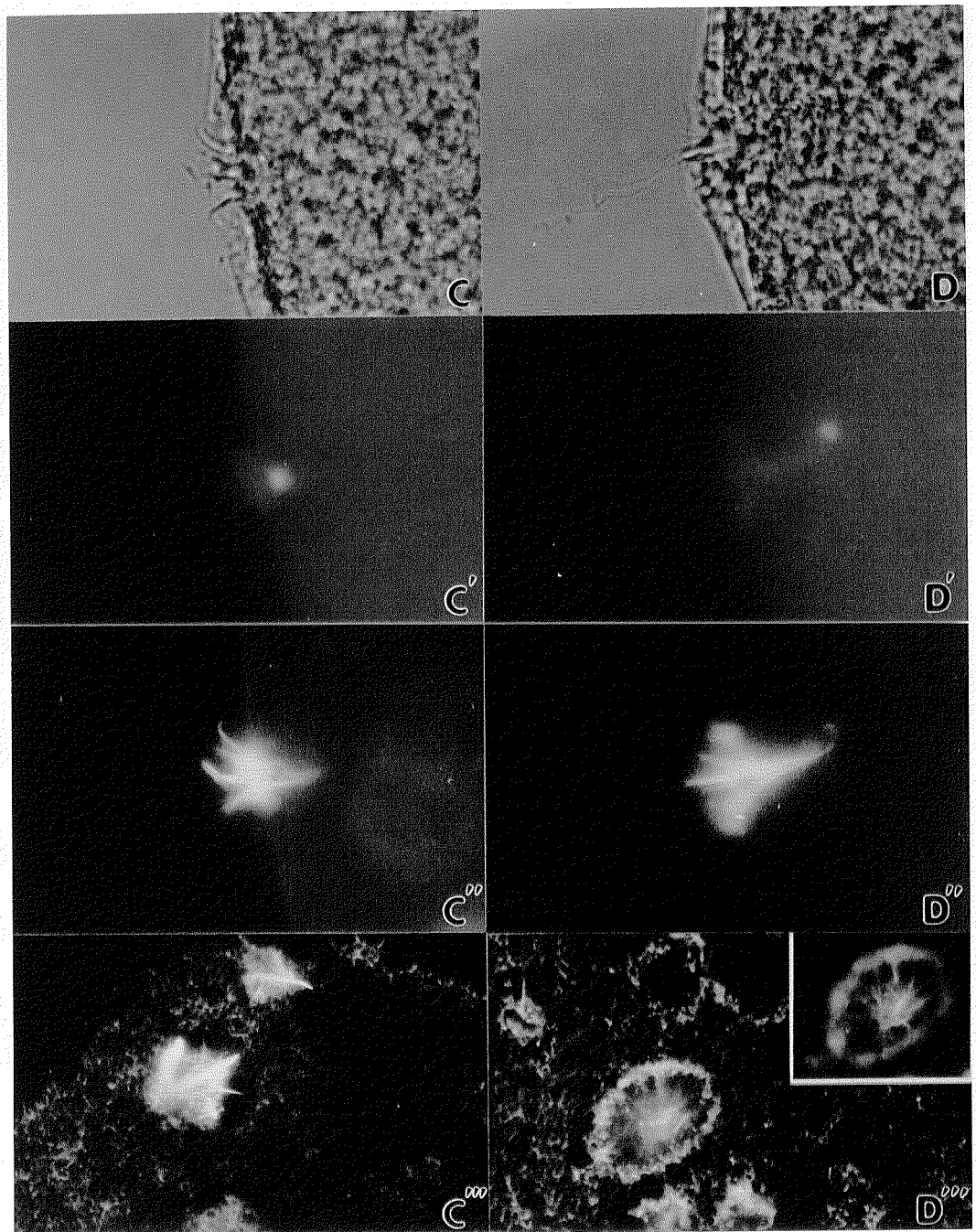


図 2-1 イトマキヒトデ過熟卵への精子侵入過程の蛍光染色 (2) (x 1,170)

C : 媒精 2 分後、精子頭部は受精丘中へ侵入していた。C' : 同一試料の DAPI 像。C'' : 同一試料の NBD-phalloidin 像。繊維構造は、卵表層まで突出していた。C''' : 同一試料より得られた単離表層の NBD-phalloidin 像。

D : 媒精 3 分後、精子尾部は卵表に観察された。D' : 同一試料の DAPI 像。精子頭部は受精丘最深部へ侵入した。D'' : 同一試料の NBD-phalloidin 像。蛍光部域は最大の大きさとなり、受精丘が最大の大きさに発達していた。D''' : 同一試料より得られた単離表層の NBD-phalloidin 像。(inset) 同一受精丘の焦点を変えて観察した像。繊維構造が垂直方向に走っているのが観察された。

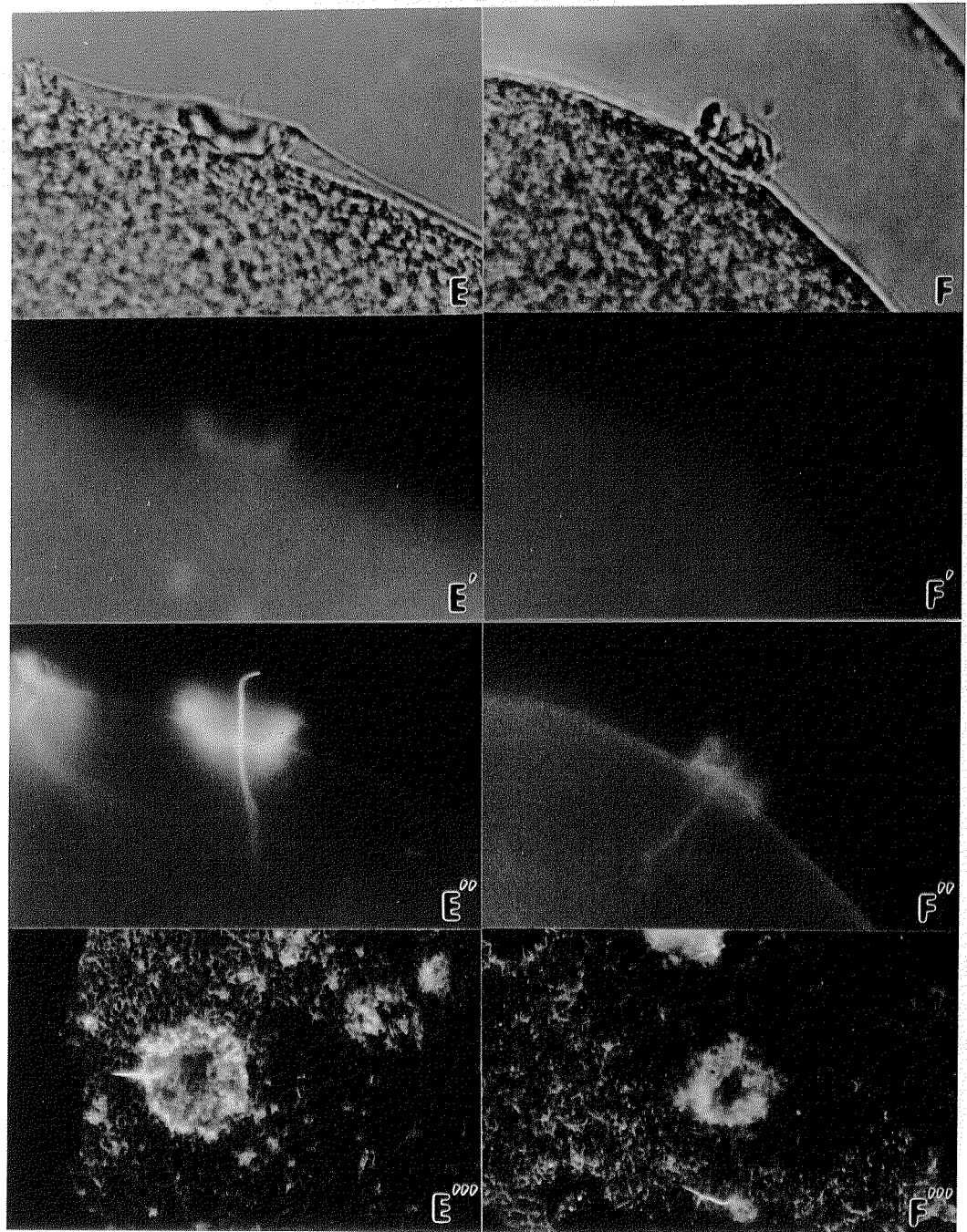


図 2-1 イトマキヒトデ過熟卵への精子侵入過程の蛍光染色 (3) (x 1,170)

E: 媒精 5 分後、受精丘の形が崩れ始めた。E': 同一試料の DAPI 像。精子核の卵内部への移動が開始した。E'': 同一試料の NBD-phalloidin 像。中央部に、強い蛍光が出現し、受精丘は内部から消失し始めた。E''': 同一試料より得られた単離表層の NBD-phalloidin 像。

F: 媒精 10 分後、受精丘は卵表の細胞質の塊として残る。F': 同一試料の DAPI 像。精子核は既に観察できなかった。F'': 同一試料の NBD-phalloidin 像。蛍光は全体に弱まっていた。F''': 同一試料より得られた単離表層の NBD-phalloidin 像。

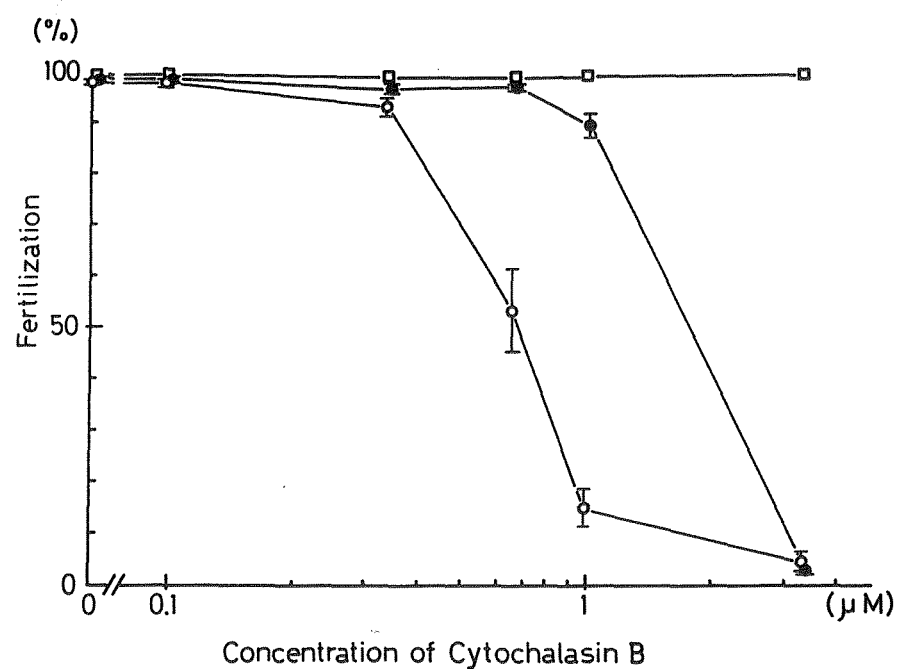


図 2-2 ヒトデ受精過程における cytochalasin B の阻害効果 (1)  
 横軸: cytochalasin B 海水処理濃度 ( $\mu\text{M}$ ) 縦軸: 受精率 (%)  
 ヒトデ過熟卵を各々の濃度の cytochalasin B 海水中で媒精し、受精膜形成率 (●) および核分裂率 (○) をみた。また、媒精後、各々の濃度の cytochalasin B 海水中に移したときの核分裂率 (□) も併せてみた。対照 (cytochalasin B 海水濃度  $0 \mu\text{M}$ ) は、 $3.3 \times 10^{-3}\%$  DMSO 海水とした。



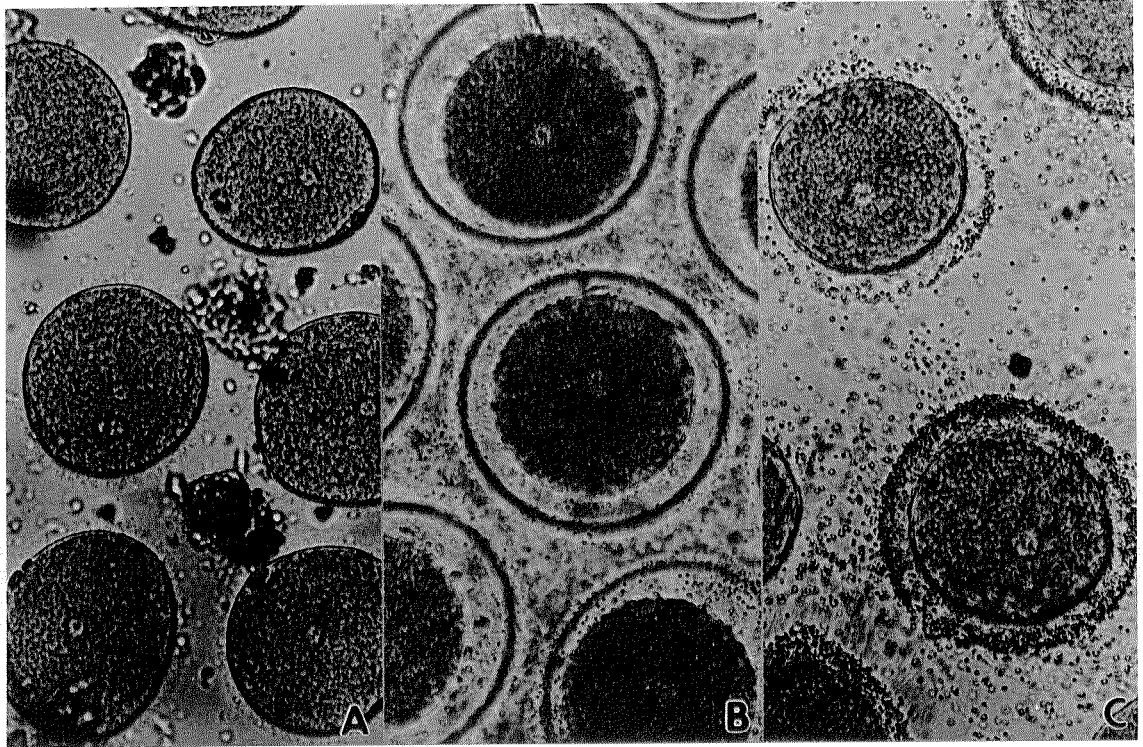


図 2-3 ヒトデ受精過程における cytochalasin B の阻害効果 (2) (x 160)

- A : 1  $\mu$ M cytochalasin B 海水中に入れ、媒精せずにそのままインキュベートした。雌性前核のセンターリングは観察されるが、cytochalasin B による単為付活は観察されなかった。
- B : 1  $\mu$ M cytochalasin B 海水中で媒精した。受精膜は形成されるが、核分裂は起こらなかった。
- C : 10  $\mu$ M cytochalasin B 海水中で媒精した。受精膜は形成されず、核分裂も起こらなかった。

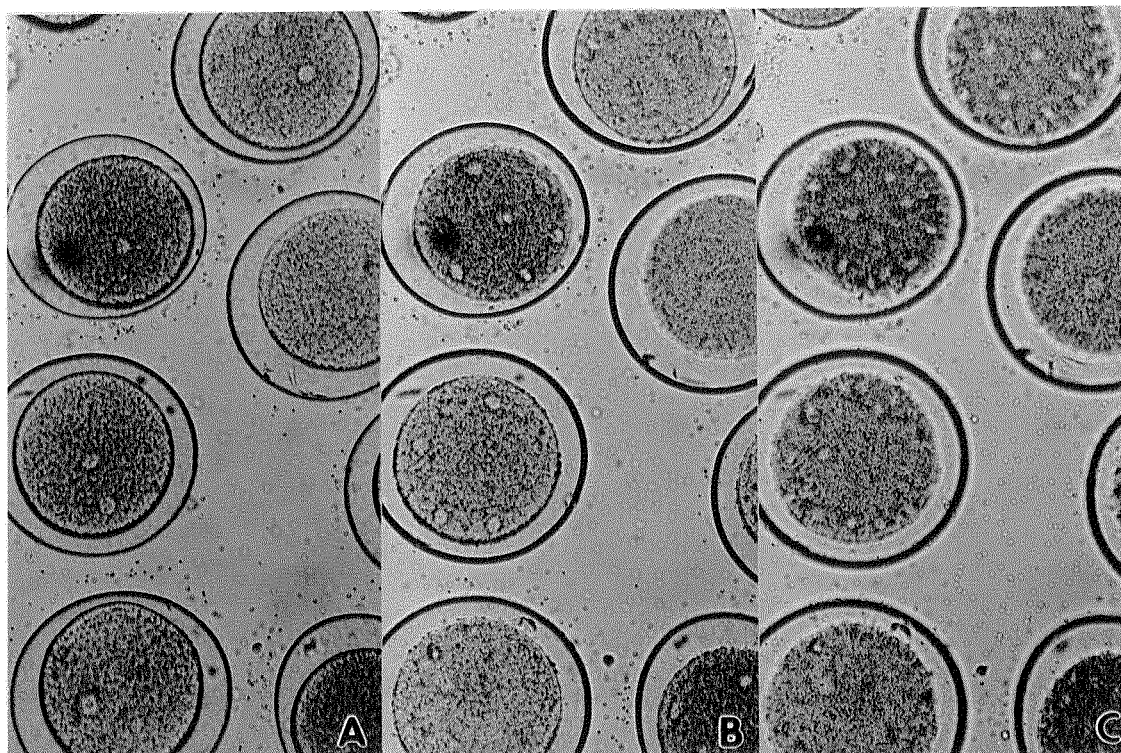


図 2-4 ヒトデ受精過程における cytochalasin B の阻害効果 (3) (x 140)  
ヒトデ過熟卵を海水中で媒精し、10 分後に  $1 \mu\text{M}$  cytochalasin B 海水中に移し、そのままインキュベートした。A) 媒精 120 分後 B) 媒精 180 分後 C) 媒精 300 分後

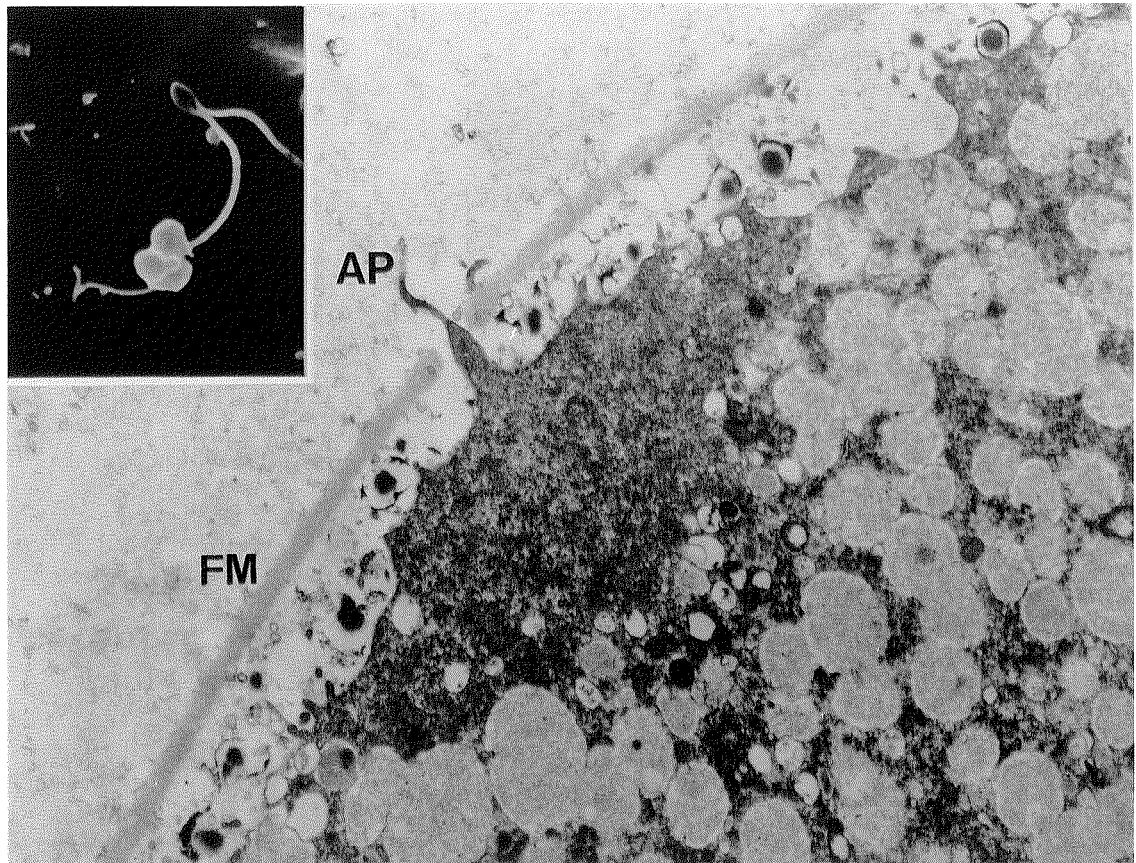


図 2-5 1  $\mu$ M cytochalasin B 海水中で媒精されたヒトデ卵表の微細構造  
( $\times 6,870$ )

ヒトデ過熟卵を、1  $\mu$ M cytochalasin B 海水中で媒精し、10 分後に固定し、透過型電子顕微鏡で観察した。精子は先体糸 (AP) 先端で卵原形質膜と融合し、受精丘の形成が開始した。卵表では受精膜 (FM) が上昇した。しかし、先体糸の受精丘中への侵入は起こらず、受精丘を形成する細胞質の一部が先体糸周囲へ上昇していた。正常受精時に観察された受精丘中の繊維構造は出現しなかった。

(inset) 同一試料の走査型電子顕微鏡による観察像。( $\times 4,670$ ) 精子は先体反応を起こし、先体糸を受精膜中へ侵入させた状態で卵表に留まっていた。

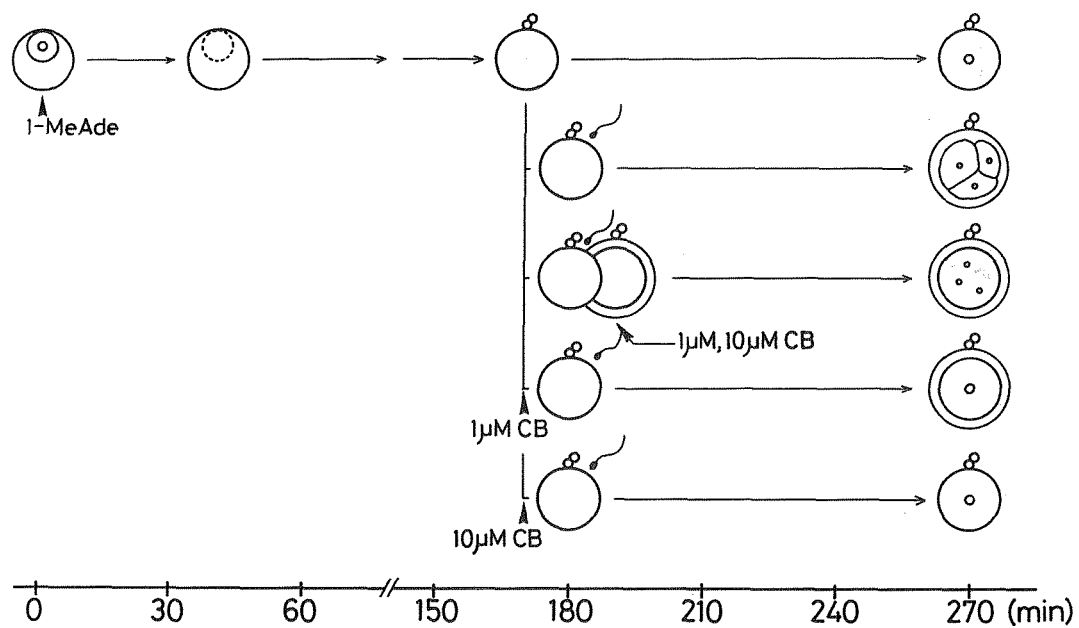


図 2-6 ヒトデ受精過程における cytochalasin B の阻害効果 (まとめ)

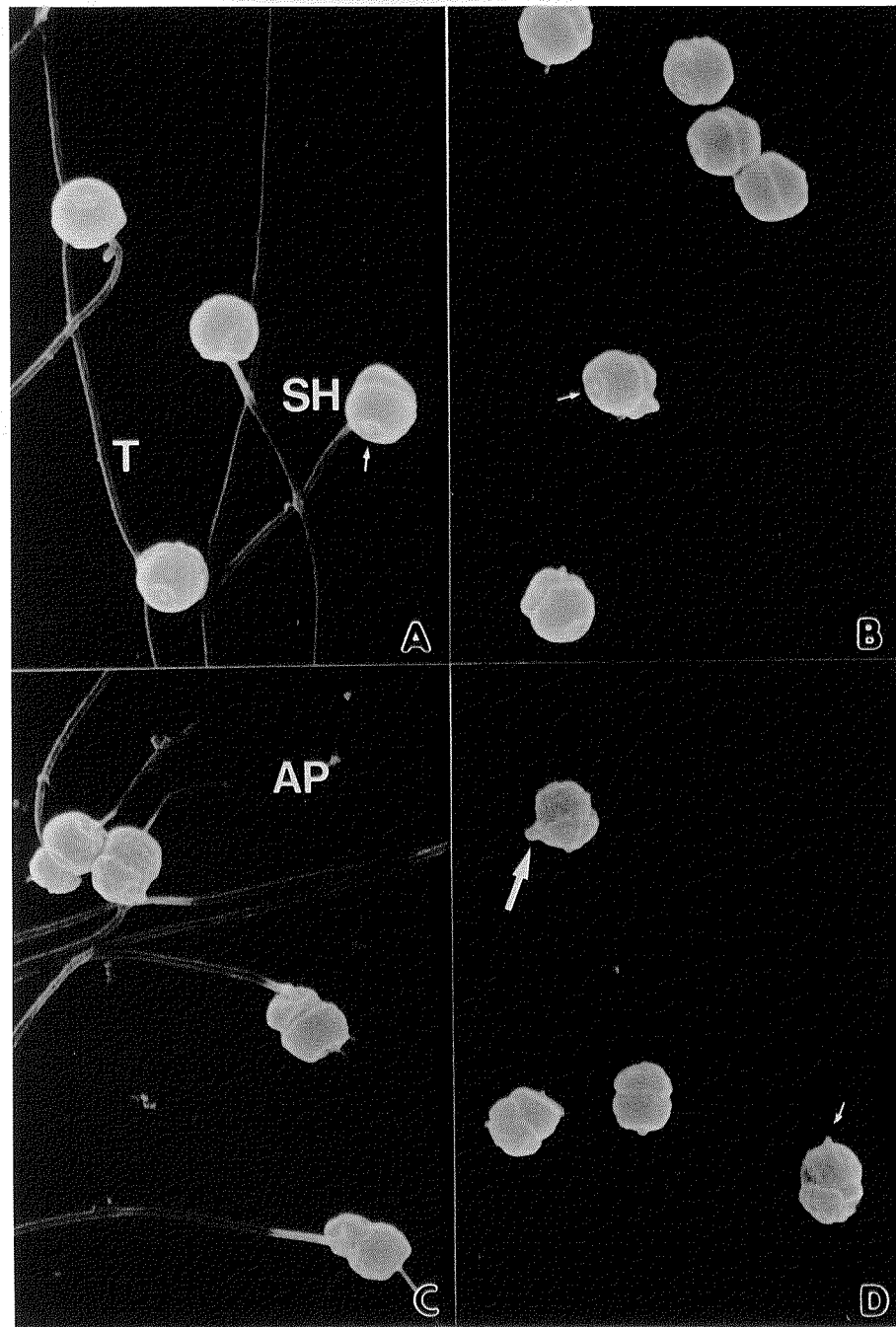


図 3-1 イトマキヒトデ精子のディスパーサー処理による微細構造の変化

イトマキヒトデ未反応精子および先体反応誘起後の精子をディスパーサー処理し、走査型電子顕微鏡により観察した。(x 5,480)

- A : 未反応精子。未反応精子は、頭部 (SH)、尾部 (T) よりなり、精子頭部先端にはくぼみ (矢印) が観察された。
- B : ディスパーサー処理後の精子頭部。精子尾部は切断されるが、頭部は傷まらずに保持されていた。頭部先端のくぼみ (矢印) も残っていた。
- C : 先体反応誘起後の精子。先体反応にともない、頭部先端に先体糸 (AP) を形成した。
- D : ディスパーサー処理後の先体反応誘起精子頭部。先体糸および尾部が切断されており、精子頭部先端には先体糸 (矢印小) および後端には尾部 (矢印大) の切断後の痕跡の観察されるものもあった。

表 3-1 ディスパーサー処理後のイトマキヒトデ精子頭部の受精能

sperm	disperser treatment <sup>1)</sup>	nuclear division(%)
AV-intact	+	98.6 ± 0.3 <sup>2)</sup>
AP-free	+	12.8 ± 3.7
AP-intact	-	96.7 ± 0.7
none		0

イトマキヒトデ精子 ( $3.6 \times 10^8/\text{ml}$ ) は、先体反応誘起前 (AV-intact) あるいは誘起後 (AP-free) にディスパーサー処理を行い、直ちにイトマキヒトデ過熟卵に媒精した。対照は、先体反応誘起後ディスパーサー処理をせずに (AP-intact)、処理したものと同時間インキュベートした後に媒精したもの、および媒精しない過熟卵とした。受精率は核分裂の進行したもので判定した。

1): ディスパーサー処理を行ったもの + ; 行っていないもの -

2): ± は標準誤差

表 3-2 先体を切断されたイトマキヒトデ精子のイトマキヒトデ裸卵への媒精

sperm	disperser treatment <sup>1)</sup>	insemination medium <sup>2)</sup>	nuclear division(%)
AV-intact	+	SW	15.9 ± 2.8 <sup>3)</sup>
AV-intact	+	EW	46.8 ± 2.0
AP-free	+	SW	12.8 ± 4.4
AP-intact	-	SW	87.2 ± 3.0
none		SW	5.4 ± 1.8

イトマキヒトデ精子 ( $3.6 \times 10^8/\text{ml}$ ) は、先体反応誘起前 (AV-intact) あるいは誘起後 (AP-free) にディスパーサー処理を行い、直ちに正常海水中 (SW) でゼリー層および卵黄膜を除去したイトマキヒトデ過熟卵に媒精した。AV-intact 精子は、ヒトデ裸卵表面で先体反応を起こさないことが考えられるため、卵海水 (EW) 中での媒精も行った。対照は、先体反応誘起後ディスパーサー処理をせずに (AP-intact)、ディスパーサー処理に要したのと同時間インキュベートした後に媒精したもの、および媒精しない過熟卵とした。受精率は核分裂の進行により判定した。

1): ディスパーサー処理を行なったもの + ; 行なっていないもの -

2): 海水中で媒精したもの SW ; 卵海水中で媒精したもの EW

3): ± は標準誤差



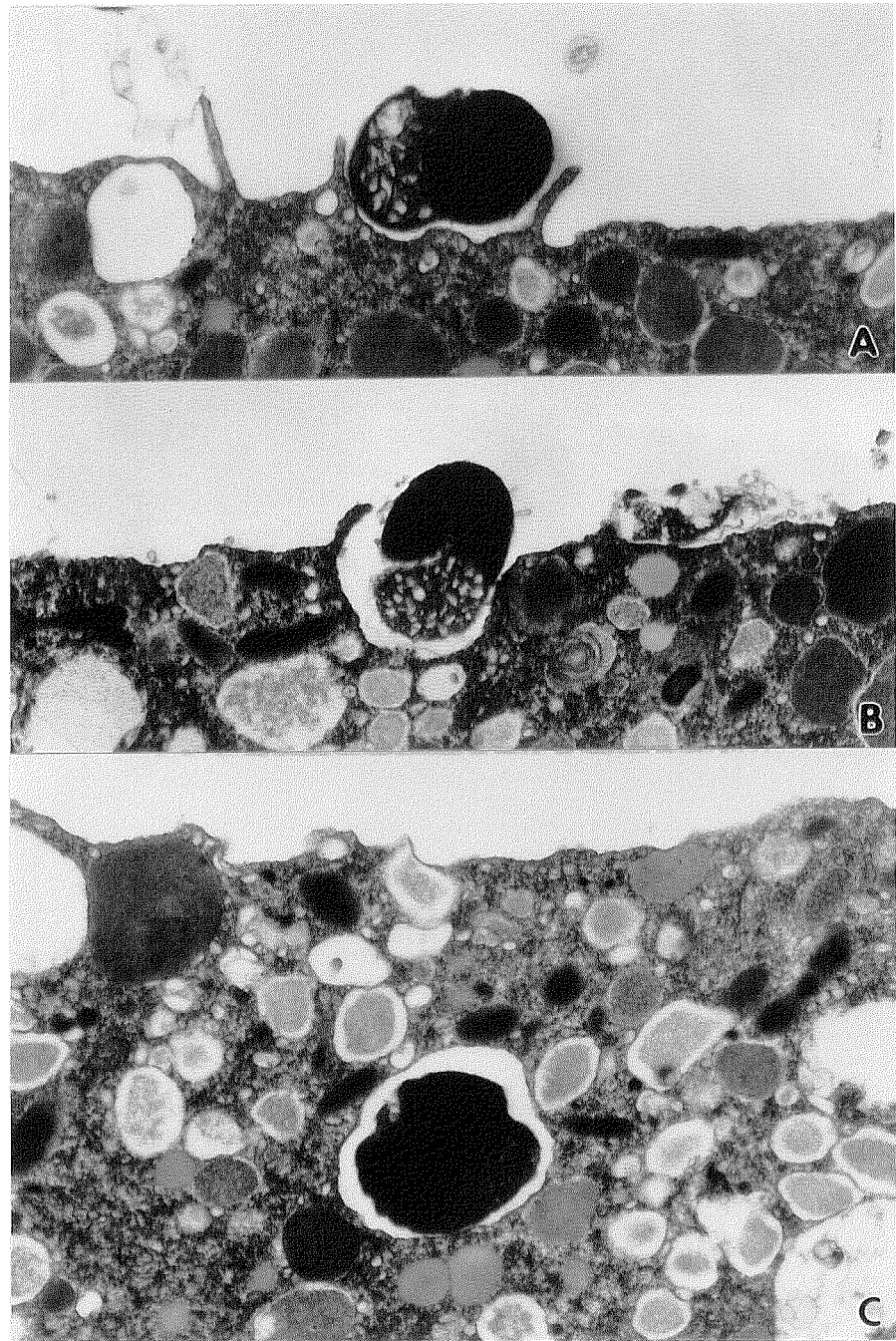


図 3-2 イトマキヒトデ精子頭部のイトマキヒトデ裸卵への媒精

先体反応誘起直後のイトマキヒトデ精子をディスパーサー処理し、ゼリー層と卵黄膜を除去したイトマキヒトデ過熟卵に媒精し、30 分後の観察像。(x 13,000)  
精子頭部は卵表と接触し、頭部側面でも結合した (A)。一部の精子頭部は卵表に包まれ (B)、卵表層に侵入した。しかし原形質膜融合は観察されなかった (C)。



表 4-1 polyethylene glycol の平均分子量と交雑受精の促進効果

MW of PEG <sup>1)</sup>	bipolar cleavage	malutipolar cleavage	non- cleavage	non- activated	cytolized
2000	0(%)	25.2	30.4	0	44.4
3000	30.8	20.9	27.6	6.5	14.2
7500	13.7	11.3	3.7	63.8	7.5
20000	1.8	1.4	2.7	90.0	4.1
control	1.6	1.0	0	97.4	0

ゼリー層および卵黄膜を除去したキタムラサキウニ卵へ、先体反応を誘起したイトマキヒトデ精子を加えた。卵は、様々な濃度の polyethylene glycol 海水で処理した。媒精 2 時間後、卵は二極型卵割 (bipolar cleavage)、多極型卵割 (malutipolar cleavage)、細胞質分裂を伴わずに核分裂のみ進行するもの (non-cleavage)、交雑受精の誘起されないもの (non-activated)、polyethylene glycol 処理後卵の壊れたもの (cytolized) に区分した。対照は、polyethylene glycol 処理を行わず、海水処理を行った。

1): polyethylene glycol の平均分子量

表 4-2 先体反応誘起精子の polyethylene glycol 処理による交雑受精の促進

Egg	Sperm	Fertilization(%)	
		Control	PEG-treated
<u>Strongylocentrotus</u> , Jelly coat-free	Non-inseminated	0	<1
	<u>Strongylocentrotus</u>	100	99.7 $\pm$ 0.3 <sup>1)</sup>
	<u>Asterina</u>	<1	3.5 $\pm$ 1.8
	<u>Asterina</u> egg water-treated	<1	28.1 $\pm$ 10.5
<u>Strongylocentrotus</u> , Vitelline coat-free	Non-inseminated	0	<1
	<u>Strongylocentrotus</u>	97.1 $\pm$ 1.8	98.9 $\pm$ 0.2
	<u>Asterina</u>	0	16.2 $\pm$ 0.9
	<u>Asterina</u> egg water-treated	3.3 $\pm$ 1.7	91.2 $\pm$ 2.1

ゼリー層を除去したキタムラサキウニ卵、およびゼリー層および卵黄膜を除去したキタムラサキウニ裸卵へ、未反応イトマキヒトデ (Asterina) 精子、先体反応を誘起したイトマキヒトデ (Asterina, egg water-treated) 精子、あるいはキタムラサキウニ (Strongylocentrotus) 精子を加えた。卵は polyethylene glycol (mw 3000) 海水で処理 (PEG-treated) し、媒精 2 時間後に核分裂の進行より受精率を算出した。対照 (control) は、polyethylene glycol 処理を行わず、海水処理を行った。

1):  $\pm$  は標準誤差

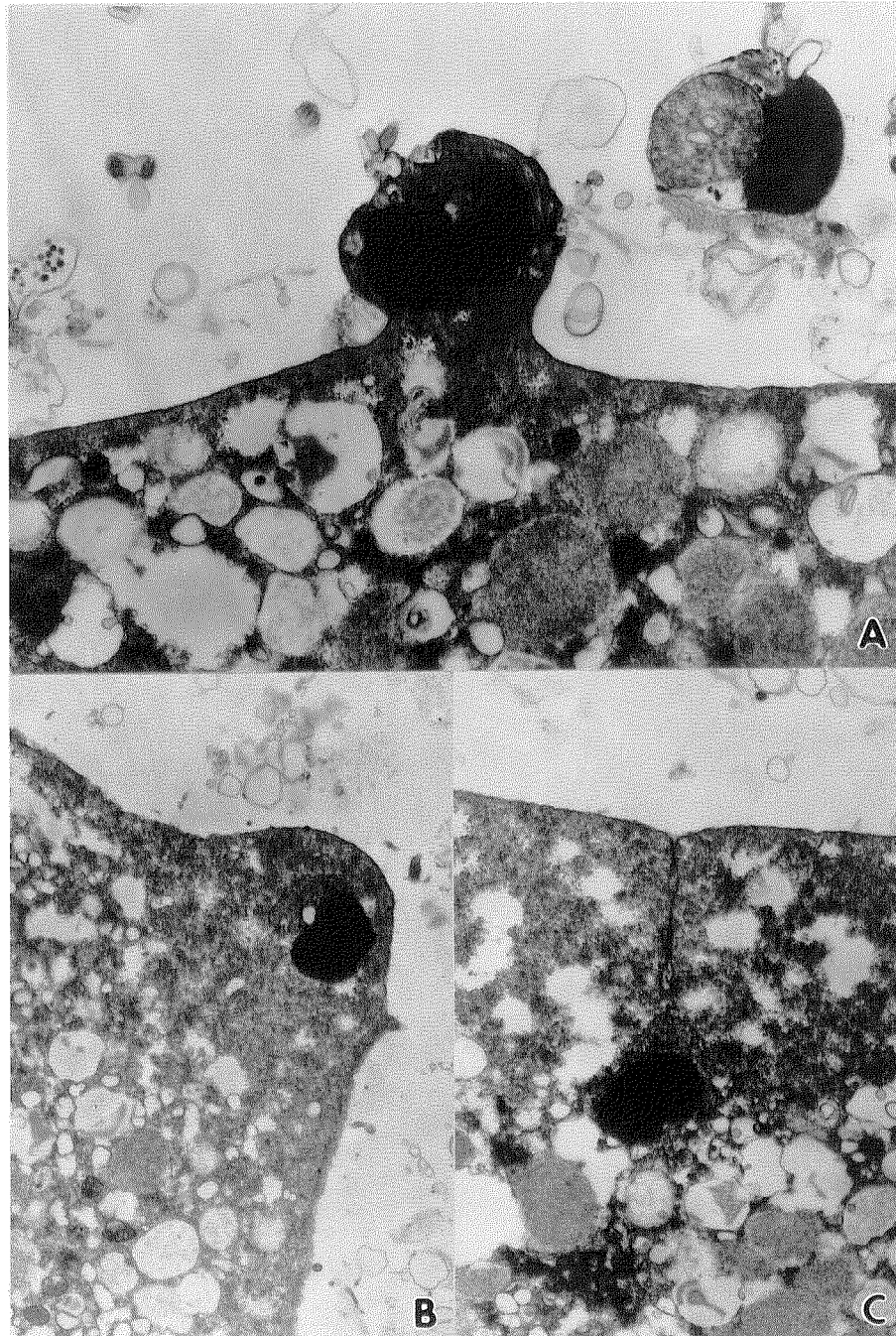


図 4-1 polyethylene glycol 処理によるイトマキヒトデ精子のキタムラサキウニ裸卵への侵入 (A: x 13,000; B,C: x 8,000)

ゼリー層および卵黄膜を除去したキタムラサキウニ裸卵へ、先体反応を誘起したイトマキヒトデ精子を加えた。卵は、polyethylene glycol (分子量 3000) 海水で 1 分間処理し、海水中に戻して 3 分後に固定し、透過型電子顕微鏡で観察した。精子頭部は、原形質膜融合をともなって、卵細胞質に包まれた (A)。卵内へ侵入した精子周囲の細胞質は、ヒトデ正常受精時に形成される受精丘を形成する細胞質と同様に、微細な細胞質顆粒よりなっていた (B,C)。

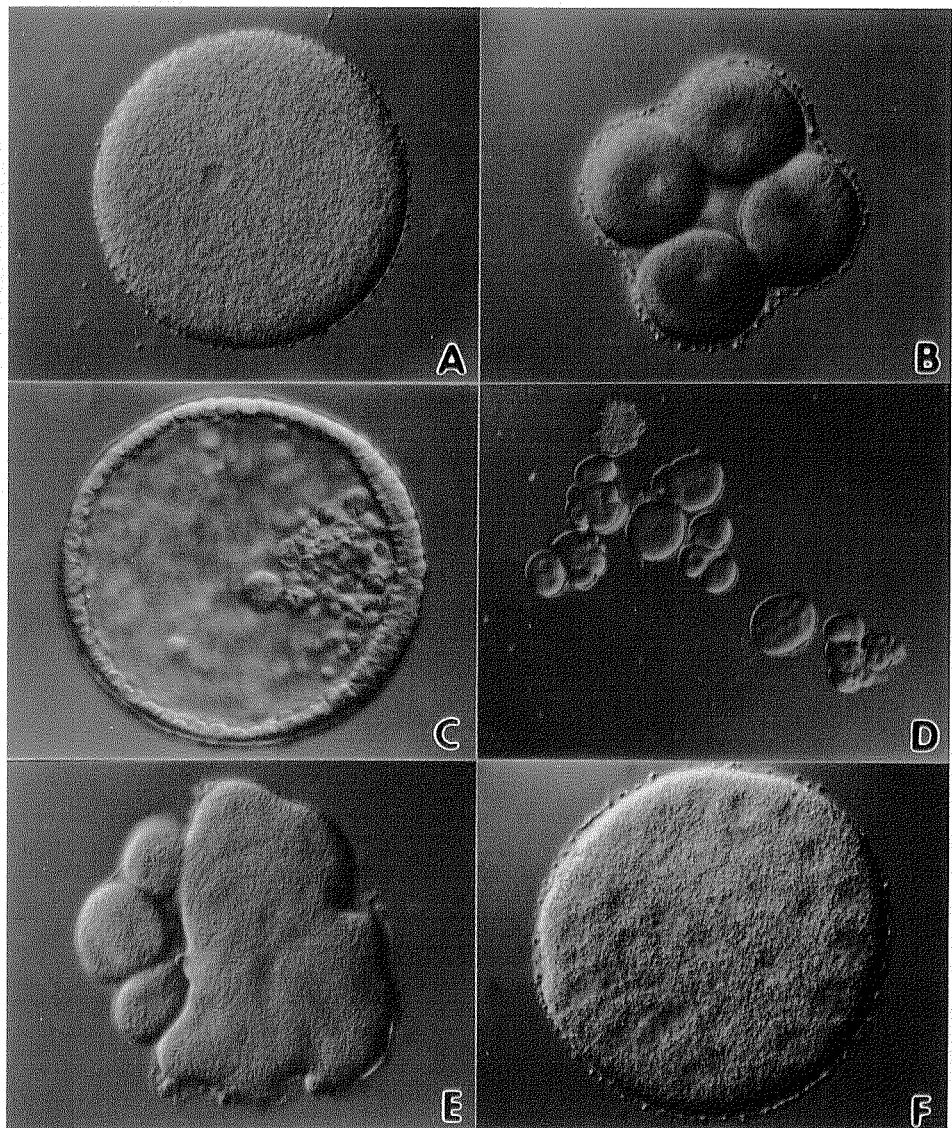
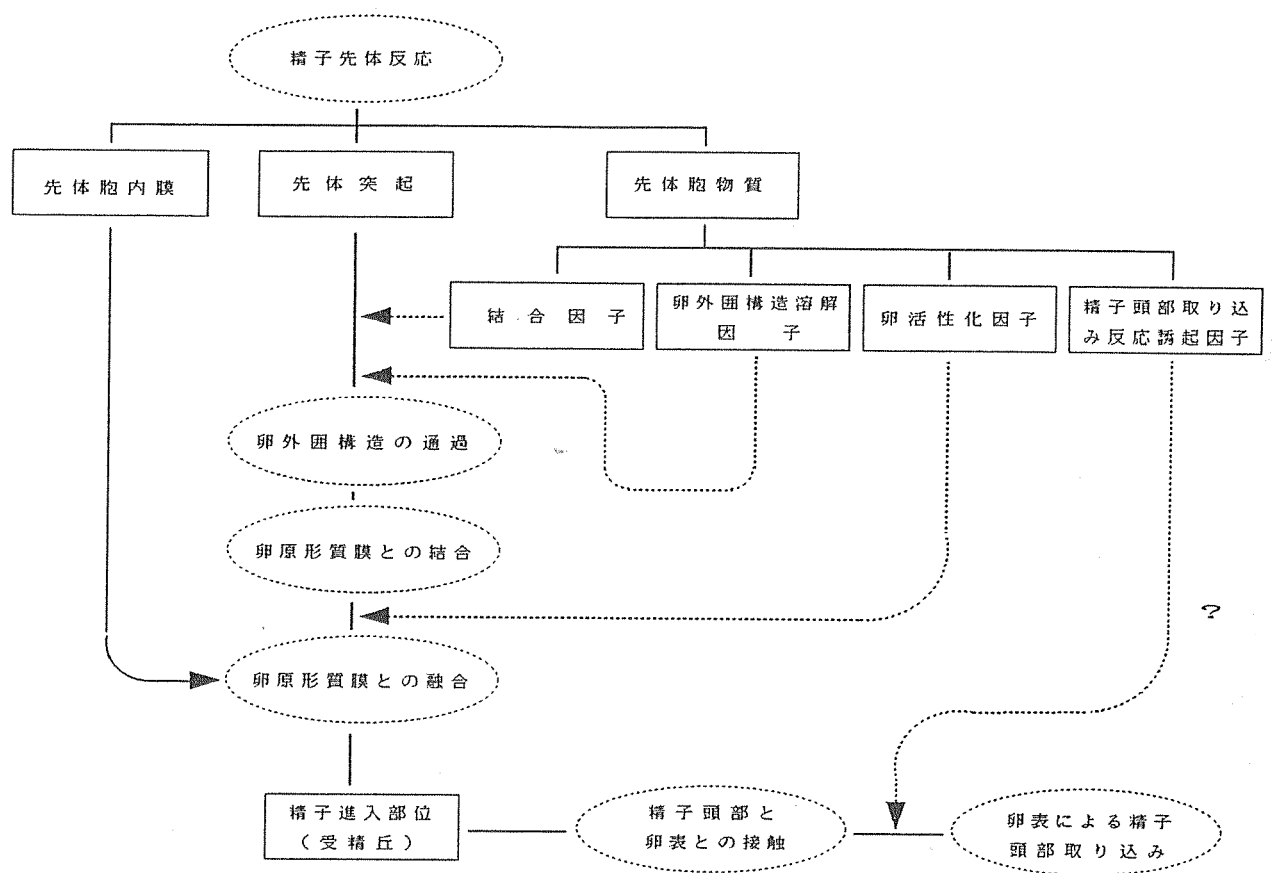


図 4-2 polyethylene glycol 処理によるキタムラサキウニ卵とイトマキヒトデ精子の交雑胚の初期発生

- A : キタムラサキウニ裸卵に先体反応を誘起したイトマキヒトデ精子を媒精すると、多数の精子が卵表に結合した。(x 500)
- B : polyethylene glycol (分子量 3000) 海水処理 2 時間後、4 細胞期になったもの。(x 500)
- C : 一部の卵では更に卵割が進行し、14 時間後に胞胚に至るが、ここで発生を停止した。(x 500)
- D : polyethylene glycol (分子量 3000) 海水処理後のキタムラサキウニ卵の低倍像。(x 100)
- E : polyethylene glycol (分子量 3000) 海水処理後、およそ 3 分の 1 の卵では多極型の分裂が進行した。(x 500)
- F : polyethylene glycol (分子量 3000) 海水処理後、他の 3 分の 1 の卵では細胞質分裂は起こらず、核分裂のみが進行した。(x 500)

図 5 - 1 先体反応の役割を示す模式図



### 参考論文

- Kyozuka K. and Osanai K. 1979 Heterospermic fertilization of sea urchin eggs pretreated with pancreatin. Bull. Mar. Biol. Stn. Asamushi, Tohoku Univ. 16: 179-188.
- Osanai K. and Kyozuka K. 1982 Cross fertilization between sea urchin eggs and oyster spermatozoa. Gamete Res. 5: 49-60.
- Kyozuka K. and Osanai K. 1984 Denuded starfish oocytes can be fertilized with acrosome-reacted sperm. Bull. Mar. Biol. Stn. Asamushi, Tohoku Univ. 17: 213-216.
- Kyozuka K. and Osanai K. 1985 Sperm entry in oyster (Crassostrea gigas) oocytes. Bull. Mar. Biol. Stn. Asamushi, Tohoku Univ. 18: 25-34.
- Kyozuka K. and Osanai K. 1988 Fertilization cone formation in starfish oocytes: The role of the egg cortex actin microfilaments in sperm incorporation. Gamete Res. 20: 275-285.
- Kyozuka K. and Osanai K. 1988 Phagocytosis of sperm heads lacking the acrosomal process by unfertilized starfish oocytes. Gamete Res. 21: 127-134.
- Kyozuka K. and Osanai K. 1988 Sperm-engulfing response of sea urchin egg surfaces inseminated with acrosome-reacted starfish sperm. Gamete Res. 21: 169-177.
- Kyozuka K. and Osanai K. 1989 Induction of cross-fertilization between sea urchin eggs and starfish sperm by polyethylene glycol treatment. Gamete Res. 22: 123-129.